

Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija

Jasmina Vraneš^{1, 2}, Vladimira Leskovač²

¹Katedra za medicinsku mikrobiologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, ²Služba za mikrobiologiju, Zavod za javno zdravstvo "Dr. Andrija Štampar"; Zagreb, Hrvatska

SAŽETAK

Sposobnost adherencije bakterija na biotičke i abiotičke površine, funkcioniranje kao zajednica, te međusobna komunikacija bakterijskih stanica, od posebne su važnosti u nastanku kroničnih infektivnih bolesti. Sesilna zajednica mikroorganizama, danas poznata kao biofilm, povezuje se s brojnim bakterijskim infekcijama. Ključne karakteristike biofilm-infekcija jesu perzistencija infekcije, te rezistencija na antimikrobne lijekove i obranu imunološkog sustava domaćina. Napretkom tehnologije i primjenom novih mikroskopskih i molekularnih metoda u proučavanju ultrastrukture i funkcionalnim odnosima unutar biofilma, nastoji se pronaći novi terapijski pristup u kontroli biofilm-infekcija, koje su jedan od najvećih izazova 21. stoljeća.

Ključne riječi: biofilm, kronične infekcije, patogeneza, liječenje

Corresponding author:

Jasmina Vraneš,
Zavod za javno zdravstvo "Dr. Andrija
Štampar",
Mirogojska cesta 16, 10 000 Zagreb,
Hrvatska
Phone: +385 1 4696 197;
Fax: +385 1 4678 006;
E-mail: jasmina.vranes@stampar.hr

Originalna prijava:

06. april 2009.;

Korigirana verzija:

08. april 2009.;

Prihvaćeno:

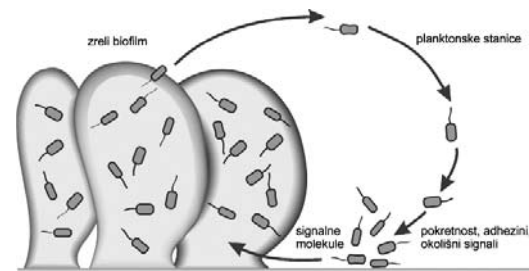
03. maj 2009.

Med Glas 2009; 6(2):147-164

UVOD

U prirodi mikroorganizmi mogu egzistirati kao planktonski organizmi - individualne stanice koje slobodno plivaju u tekućem mediju; ili u obliku sesilne zajednice - biofilma. Biofilm je izrazito rasprostranjen način života u okolišu, gotovo na svakoj granici vode i zraka, te zemlje i vode (1, 2). U protekla dva desetljeća definicija biofilma se neprestano mijenjala jer svako novo istraživanje nadograđuje postojeće znanje o stvaranju, strukturi, sazrijevanju, te rezistenciji biofilma. Objedinjenjem spoznaja o već poznatim karakteristikama, te novootkrivenim fiziološkim osobinama, biofilm je danas definiran kao sesilna zajednica mikroorganizama čije su stanice ireverzibilno povezane sa supstratom i međusobno, te uklopljene u izvanstanični matriks polisaharidnih polimera koji su same stvorile, a ispoljavaju izmijenjen fenotip uslijed promijenjene brzine razmnožavanja i transkripcije gena koje ne uočavamo u planktonskih organizama (3). Formiranje biofilma započinje kondicioniranjem neke površine polimerima iz vodenog okoliša što omogućuje adherenciju mikroorganizama (2). Površine na kojima se može naći biofilm jesu, primjerice, metal, plastika, kamen, čestice zemlje, medicinski implantati, te tkiva (2). Nakon početnog, reverzibilnog vezivanja planktonskih stanica za površinu supstrata, slijedi stvaranje stabilne veze posredovane adhezina na staničnoj stijenci bakterija, a potom proliferacija, te nakupljanje bakterijskih stanica u višeslojne stanične nakupine i stvaranje izvanstaničnog polisaharidnog matriksa. Održavanje takve višestanične zajednice bilo bi teško bez postojanja međustanične komunikacije bakterijskih stanica, posredovane malim signalnim molekulama sa sposobnošću difuzije u izvanstanični okoliš (4). Nakupljanje signalnih molekula u okolišu omogućuje svakoj pojedinoj bakterijskoj stanici procjenu stanične gustoće, odnosno ukupnog broja bakterija, a ta se pojava naziva detekcija kvoruma (engl. *quorum sensing*). Signalne molekule u gram-negativnih bakterija jesu N-acil-homoserinski laktoni (AHL), a u gram-pozitivnih su mali ili modificirani peptidi (Slika 1) (4). Koncentracija signalnih mole-

kula postignuta pri točno određenoj, kritičnoj gustoći stanica, postaje dovoljna za aktivaciju gena uključenih u sintezu faktora virulencije ili sekundarnih metabolita (4, 5). Maturacija biofilma odvija se u pet razvojnih stadija (6). Prvi stadij je reverzibilno povezivanje, u kojem se planktonske stanice tek kratkotrajno povezuju sa supstratom, a nakon toga slijedi drugi stadij, ireverzibilno povezivanje, u kojem se planktonske stanice čvrsto vežu na površinu supstrata i gube svojstvo pokretljivosti (6). Treći stadij jeste maturacija I za koji je karakteristično stvaranje izvanstaničnog matriksa, te povećavanje i višeslojnost mikrokolonija (6). Mikrokolonije, najčešće gljivolikog ili stupičastog izgleda, svoju maksimalnu veličinu dosežu u stadiju maturacije II (6). Proces maturacije biofilma završava petim stadijem, disperzijom, u kojem se između mikrokolonija formiraju vodeni kanalići, a same mikrokolonije mijenjaju svoj oblik u školjkasti, uslijed izdvajanja bakterijskih stanica smještenih u središnjem dijelu mikrokolonija u potrazi za novim i boljim izvorom hranjivih tvari (6). Biofilm može činiti samo jedna bakterijska vrsta, no češće se sastoji od više vrsta bakterija, ili bakterija i gljiva (1, 3). Jednom pričvršćeni za površinu, mikroorganizmi biofilma mogu, svojim aktivnostima, doprinosti ili štetiti zbivanjima u okolišu, ovisno o uvjetima koji u njemu vladaju. Poznato je da ove sesilne zajednice sudjeluju u razgradnji brojnih onečišćivača okoliša, stvaranju i razgradnji organske tvari, te u kruženju dušika, sumpora i drugih elemenata u prirodi (7-10). Prije saznanja o postojanju, strukturi i karakteristikama biofilma, biotehnolozi su već koristili prednosti biofilma u sustavima za pročišćavanje voda, pri uklanjanju opasnih tvari koje su kontaminirale zemlju i podzemne vode, te pri ekstrakciji plemenitih metala iz rudače (11-13). No, pozitivna djelovanja biofilma daleko su



Slika 1. Stvaranje biofilma (Alma Šimunec Jović, 2007.)

rjeđa od štetnih koja uzrokuju ogromne ekonomske gubitke u agrokulturi i industriji, te mnogobrojne probleme u medicini. Biofilm se povezuje sa stafilokoknim mastitisom u goveda (14), biokorozijom (deterioracijom metalnih materijala u prisutnosti biofilma) vodenih sustava u industriji (15), te naftnih cjevovoda (16), kao i problemima u industriji prehrambenih i papirnatih artikala (17-18). U medicini biofilm se povezuje s brojnim kroničnim infekcijama (1), te različitim infekcijama biomaterijala poput kateterâ, protezâ, implantatâ, te drugih medicinskih naprava od metala ili plastičnih polimera koji se nalaze u ljudskom organizmu (1, 19). Prema procjenama Centra za kontrolu bolesti i prevenciju iz Atlante, biofilm se povezuje s gotovo dvije trećine bakterijskih infekcija (3). Brojnost, kroničan tijek, te rezistencija na antimikrobnu terapiju, tek su neke od značajki biofilm-infekcija, koje su jedan od najvećih izazova medicine 21. stoljeća.

REZISTENCIJA BIOFILMA

Perzistencija infekcija uzrokovanih mikrobnim biofilmom kontinuirano motivira istraživače u potrazi za jedinstvenim mehanizmom rezistencije biofilma, kako na antimikrobne lijekove, tako i na dezinfekcijska sredstva (3). Poznato je da su bakterije, unutar biofilma, 10-1.000 puta rezistentnije na djelovanje antimikrobnih lijekova nego planktonske stanice, što govori u prilog postojanja mehanizma rezistencije kojeg potencijalno posjeduju svi patogeni, no koji se ispoljava samo pri tvorbi biofilma (20, 21). Proučavanjem biofilma takav mehanizam još nije utvrđen, niti su otkriveni mutanti u planktonskim kulturama koji bi govorili tomu u prilog (21), pa se trenutno rezistencija biofilma objašnjava tek hipotezama. Hipoteze starijeg datuma, kao moguće mehanizme rezistencije, navode oslabljenu difuziju antimikrobnih lijekova u biofilm (20, 22) ili promjene u mikrokolištu biofilma koje utječu na brzinu razmnožavanja mikroorganizama, odnosno djelotvornost antimikrobnih lijekova u dubini biofilma (20, 22). Oslabljen difuzija antimikrobnih lijekova objašnjava se dvojako; s jedne strane, interakcijom molekula

s egzopolisaharidnim matriksom biofilma, koji djeluje poput "molekularnog sita" na velike molekule ili kao ionski izmjenjivač na hidrofilne, pozitivno nabijene molekule antimikrobnih lijekova (1, 22, 23); te, s druge strane, enzimskom razgradnjom, kojom se biofilm štiti od molekula, kao, primjerice, vodikovog peroksida ili β -laktamskih antimikrobnih lijekova (20, 23). Kao što je vidljivo, primjenjivost ove hipoteze ovisna je o prirodi samog lijeka, no nisu svi antimikrobni lijekovi visokoreaktivne molekule poput, primjerice, aminoglikozida, pa ih većina, vjerojatno, ipak penetrira u biofilm (23). Biofilm je prostorno heterogeničan (24). S porastom debljine slojeva stanica u biofilmu, mijenjaju se i uvjeti mikrokolišta, poput dostupnosti hranjivih tvari, prisutnosti kisika ili kiselih otpadnih metaboličkih tvari (20, 22, 25). Sve to utječe na brzinu razmnožavanja bakterijskih stanica, koje, u takvim uvjetima, prelaze u stacionarnu fazu u kojoj su manje osjetljive na baktericidno djelovanje antimikrobnih lijekova, osobito onih čije je ciljno mjesto djelovanja sinteza makromolekula (26). Novija hipoteza jeste hipoteza perzistera. Većina stanica biofilma, kao i planktonske stanice koje se oslobađaju s površine biofilma, osjetljive su na antimikrobnu terapiju (23, 27). Naprotiv, samo mala frakcija stanica (0,1-10% svih stanica biofilma) neosjetljiva je na produženu izloženost ili više koncentracije antimikrobnih lijekova, te perzistira usprkos terapiji (26). Premda su perzisteri otkriveni još sredinom 20. stoljeća u planktonskim kulturama (21), o njihovoj se prirodi još uvijek malo zna. Za sada je poznato da perzisteri nisu mutanti (21), te da ne predstavljaju poseban stadij staničnog ciklusa bakterija (23). Pretpostavlja se da je riječ o fenotipskoj varijanti koja je, iz divljeg tipa, spontano ušla u stanje promjenjivih fenotipskih obilježja (26). Mehanizam nastanka perzistera još je manje poznat. Do sada je utvrđeno da ove stanice ne nastaju kao odgovor na antimikrobnu terapiju (21, 27), te da bakterijske signalne molekule, kojima se detektira stanična gustoća, nemaju nikakva utjecaja na stvaranje perzistera (21, 27). U novije vrijeme pretpostavlja se da u kontroli stvaranja perzistera sudjeluju dva procesa. Jedan

je promjena razine specifičnih perzister-proteina (27), ovisno o fazi razvitka biofilma (21), a drugi je kontroliranje razine ekspresije tih proteina, koja ovisi o gustoći stanica (27), te o faktorima mikrookoliša, poput niske koncentracije supstrata (26). Misli se da perzister-proteini induciraju prelazak bakterija u stanje mirovanja, tzv. *dormant* fazu (27), što rezultira tolerancijom na antimikrobne lijekove uslijed utišane ekspresije gena u biosintetskim putevima ovih stanica, a time i onemogućavanjem djelovanja lijekova na njihova ciljna mjesta (21, 27). Ako znamo da perzisteri postoje i u planktonskim kulturama (23, 27), onda se nameće pitanje kako perzisteri biofilma doprinose njenoj visokoj rezistenciji. Odgovor leži u sinergističkom djelovanju imunološkog sustava i antimikrobnih lijekova. Dok imunološki sustav uništava i uklanja zaostale planktonske perzistere (21, 23, 27), spram perzistera biofilma je nemoćan jer su ovi zaštićeni egzopolisaharidnim matriksom (23, 27) i nakon što se smanji koncentracija lijeka (21, 27) ili prekine terapija uslijed nestanka simptoma bolesti (23), perzisteri obnavljaju biofilm, oslobađaju se nove planktonske stanice i simptomi bolesti se vraćaju (21, 23).

ULOGA BIOFILMA U NASTANKU KRONIČNIH INFEKCIJA U LJUDI

Akutne bakterijske infekcije, koje izazivaju planktonski oblici patogenih bakterija, stoljećima su odnosile ljudske živote. Razvoj antimikrobnih lijekova i cjepiva omogućio je stjecanje kontrole nad ovim akutnim bolestima, te se može reći da one sada, uglavnom, pripadaju prošlosti. Sredinom prošlog stoljeća započela je postantibiotska era, odnosno era biofilm-infekcija. Ove infekcije perzistiraju mjesecima i godinama, izmjenjuju se periodi odsutnosti kliničkih simptoma infekcije s akutnim egzacerbacijama, manje su agresivne od akutnih infekcija, te pogađaju umjereno kompromitirane osobe (28). Uročnici biofilm-infekcija jesu bakterijske vrste koje se nalaze u okolišu ili koje nalazimo kao komezale ljudskog organizma (3, 29), a koje već stoljećima, u svom prirodnom okolišu, postoje u obliku biofilm-zajednice.

Biofilm se, u ljudskom organizmu, razvija na vitalnom ili nekrotičnom tkivu, te na inertnim površinama različitih biomaterijala (29). Bez obzira radi li se o kroničnoj infekciji ili o infekciji biomaterijala, ove biofilm-infekcije imaju iste kliničke karakteristike, a to su spor nastanak na jednom ili više mjesta u organizmu, te kasna pojava simptoma bolesti (29). Nekoliko karakteristika biofilm čini jedinstvenim u procesu nastanka infekcije. Prva od njih jeste mogućnost disperzije stanica ili agregata biofilma, što može rezultirati nastankom embolusa, ili pak infekcijom mokraćnog ili krvožilnog sustava (2, 30). Disperzija pojedinih stanica nastaje uslijed odvajanja stanica-kćeri iz aktivno-razmnožavajućih stanica, te kao posljedica promjene dostupnosti hranjivih tvari ili detekcije kvoruma (2), a odvajanje manjih dijelova biofilma nastaje pod utjecajem brzine protoka tekućine u neposrednoj blizini površine biofilma (2, 30). Dok pojedine stanice, ubrzo nakon odvajanja, poprimaju fenotip planktonskih stanica, čini se da čestice biofilma zadržavaju određene karakteristike biofilma, poput antimikrobne rezistencije (2, 30). Antimikrobnom terapijom eradikiraju se planktonske stanice oslobođene iz biofilma, što rezultira povlačenjem simptoma akutne egzacerbacije bolesti, no ne uspijeva se uništiti sesilna zajednica (2, 29, 30). Rekurirajući simptomi biofilm-infekcije u konačnici će nestati tek nakon uklanjanja biofilma kirurškim zahvatom ili odstranjenjem inficiranog biomaterijala (29, 30). Slijedeća jedinstvena karakteristika biofilm- infekcija jeste rezistencija biofilma na stanični i humoralni odgovor imunološkog sustava domaćina. U početku se smatralo da rezistenciji pridonosi interferencija egzopolisaharidnog matriksa biofilma s kemo-taksijom polimorfonuklearnih leukocita (PMN) (31), te s prodorom baktericidnih i opsonizirajućih protutijela (28, 31). Danas je poznato da aktivirani PMN penetriraju u biofilm, ulaze u vodene kanaliće, te penetriraju u mikrokolonije, no tamo ne uspijevaju fagocitirati stanice biofilma koje se nalaze u njihovoj neposrednoj blizini (32). Mehanizam ove neuspješne fagocitoze tek predstoji objasniti (32). Opsonizirajuća protutijela, dio humoralne obrane, u slučaju biofilm-

infekcije, dijele sudbinu polimorfonuklearnih leukocita. Iako prodiru u dubinu biofilma (33), u matriks ulaze u interakciju s antigenima koji su tamo u suvišku, te uslijed toga ne dopijevaju do antigena na površini stanica biofilma, što onemogućuje njihovo opsonizirajuće djelovanje i posljedično uništavanje stanica biofilma (33). Perzistencija kroničnih infekcija, nemogućnost detekcije mikrobnog uzročnika standardnim mikrobiološkim tehnikama kultivacije u većini slučajeva, te neuspjeh antimikrobne terapije i imunološkog sustava domaćina u eradikaciji uzročnika, naveli su neke znanstvenike na pomisao da kronične infekcije uzrokuje biofilm. Ovu tezu valjalo je potkrijepiti istraživanjem sesilnih zajednica *in situ*, što, uslijed nedostatka raspoloživih metoda, nije bilo ostvarivo sve do unazad dvadesetak godina. Razvoj i primjena konfokalnog skenirajućeg laserskog mikroskopa (engl. *confocal scanning laser microscope*, CSLM) omogućila je istraživanje ultrastrukture biofilma (1-3), a nove molekularne tehnologije, poput primjene fluorescentnih rRNK-usmjerenih proba, te fluorescentne *in situ* hibridiza-

cije (FISH), doprinijele su identifikaciji i kvantifikaciji uzročnika biofilma, te razumijevanju njihovih međusobnih funkcionalnih odnosa (1). Mogućnost vizualizacije i proučavanja biofilma na biomaterijalima, te u humanim uzorcima, rezultirala je intenzivnim istraživanjima brojnih infekcija i njihove povezanosti sa stvaranjem biofilma (13). Danas se biofilm, uz infekcije biomaterijala, povezuje s brojnim kroničnim infekcijama. Najčešće kronične infekcije, te njihove uzročnike, prikazuje Tablica 1.

PERIODONTITIS

U periodontalne bolesti ubraja se cijeli niz poremećaja potpornog tkiva zubi, od kojih pobolijeva gotovo 90% svjetske populacije. Najblaži oblik periodontalne bolesti je gingivitis, reverzibilna upala gingive (desni), a najteži, kronični periodontitis, kronična destrukcija periodontalnog tkiva (gingive, periodontalnog ligamenta i alveolarne kosti) koji može rezultirati gubitkom zubi (3). Primarno mjesto periodontalne infekcije jeste prostor između korijena zuba

Tablica 1. Najčešći uzročnici kroničnih infekcija povezanih s biofilmom (The most common etiology of chronic infections involving biofilm)

Kronična infekcija Chronic infection	Uobičajen bakterijski patogen biofilma Common biofilm bacterial pathogen
Endokarditis nativnih valvula Native valve endocarditis	Streptokoki viridans grupe Viridans group streptococci
Periodontitis	Gram-negativne anaerobne bakterije Gram-negative anaerobic bacteria
Periodontitis	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Cistična fibroza Cystic fibrosis	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Kronični bakterijski prostatitis Chronic bacterial prostatitis	Gram-negativne enterobakterije Gram-negative enterobacteria
Kronični cistitis Chronic cystitis	Uropatogena <i>Escherichia coli</i> Uropathogenic <i>Escherichia coli</i>
Inficirani bubrežni kamenci Infected kidney stones	Ureaza-producirajuće enterobakterije Urease-producing enterobacteria
Kronični otitis media Chronic otitis media	<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Mišićno-koštane infekcije Musculoskeletal infections	Gram-pozitivni aerobni koki Gram-positive aerobic cocci
Nekrotizirajući fasciitis Necrotizing fasciitis	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Infekcije bilijarnog sustava Biliary tract infection	<i>Enterobacteriaceae</i>
Osteomijelitis Osteomyelitis	Različite bakterijske i gljivične vrste Various bacterial and fungal species
Meloidoza Meloidosis	<i>Pseudomonas pseudomallei</i> <i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Kronične rane Chronic wounds	Različite aerobne i anaerobne bakterijske vrste Various aerobic and anaerobic bacterial species

i gingive, koji se naziva subgingivalna pukotina, a koji se, s progresijom bolesti, može produbiti u periodontalni “džep”. Inače, smatra se da periodontitis nastaje kao posljedica poremećaja ekvilibrija u dentalnom plaku (34). Dentalni plak je mikrobní biofilm kojeg sačinjavaju mikroorganizmi normalne flore usne šupljine (34). Iako je dentalni plak najproširenija sesilna zajednica u ljudi, klinički se znakovi periodontitisa javljaju samo u onih kod kojih kronično prisustvo dentalnog plaka izaziva pojavu imunološkog odgovora i upale (35). To je uvjetovano osjetljivošću domaćina ili promjenom uvjeta u mikrookolišu usne šupljine (36). Osjetljivost domaćina određuju genetski i okolišni faktori, te stečene navike poput pušenja (35). Iako je upalni odgovor domaćina protektivan, destrukcija gingivalnog i periodontalnog tkiva može nastati ukoliko je preslabo ili prejako izražen (35). Destrukciji tkiva doprinosi i ekspresija faktora virulencije mikroorganizama u trenutku kada se, uslijed povećanog protoka tekućine u gingivalnim pukotinama i dotoka hranjivih tvari, te povišenja pH, mijenja mikrookoliš u oralnoj šupljini (34, 36). Nastanak dentalnog plaka odvija se u tri koraka. Neposredno, nakon čišćenja površine zubi, izloženi dijelovi cakline bivaju obloženi proteinskim kondicionirajućim filmom, koji služi kao supstrat ranim bakterijskim kolonizatorima (1, 2, 37). Predominantni kolonizatori ranog biofilma su streptokoki (38), poput bakterija *Streptococcus gordonii*, *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. parasanguis* i brojnih drugih (1, 38). Čimbenici koji favoriziraju streptokoke, kao inicijalne kolonizatore, jesu ekspresija adhezina koji prepoznaju receptore na kondicionirajućem filmu; sposobnost da, kao jedine izvore hranjivih tvari, metaboliziraju komponentne sline; te izrazita sposobnost intra- i inter-generičke koagregacije (38, 39). Procesom koagregacije, međustaničnog prepoznavanja i adhezije genetički različitih bakterija, te metaboličkim interakcijama drugih bakterija sa streptokokima, rani biofilm ubrzo postaje multigenerička mikrozaednica koju čine aerobne i aerotolerantne bakterijske vrste rodova *Gemella*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Haemophilus*, te *Neisseria* (38, 40). Skenirajućim elektronskim

mikroskopom uspješno je prikazana dinamika stvaranja oralnog biofilma (39). Pojedinačne i manje nakupine stanica uočavaju se već nakon četiri sata, mikrokolonije nakon osam sati, a nakon 12 sati na caklini se može uočiti monosloj bakterija. Ključnim posrednikom procesa koagregacije između ranih i kasnih kolonizatora u dentalnom plaku smatra se bakterija *Fusobacterium nucleatum* (41). Također se smatra kako ova gram-negativna bakterija promovira stvaranje anaerobnog mikrookoliša koji striktno-anaerobnim, kasnim kolonizatorima, omogućuje preživljavanje u aerobnoj atmosferi (41). Kasni kolonizatori su gram-negativne anaerobne bakterije, poput *Porphyromonas gingivalis*, *Tanarella forsythensis* i *Treponema denticola* (42). Apikalnom progresijom supragingivalnog plaka nastaje subgingivalni plak, a promjenom integriteta spojnog epitela dolazi do postupene kolonizacije površine zuba i stvaranja periodontalnog “džepa”. U studijama bakterijske etiologije subgingivalnog biofilma, a time i periodontitisa, najčešće su bile korištene klasične metode kultivacije i molekularne identifikacijske metode, koje su, kao periodontalne patogene, identificirale proteolitičke vrste bakterija, koje su već navedene kao kasni kolonizatori dentalnog plaka (42). Kloniranjem i sekvencioniranjem gena bakterijske 16S rRNA u uzorcima subgingivalnog plaka osoba s periodontitisom, otkrilo se kako bakterije *P. gingivalis*, *T. forsythensis* i *T. denticola* čine tek manji dio zajednice, a kako dominiraju bakterije *Peptostreptococcus* sp. i *Filifactor* sp. Prevencija nastanka periodontitisa bazira se na kontroli nastanka oralnog biofilma, no za sada su se mehaničko odstranjivanje i kemijska kontrola pokazali neuspješnim (34). Nove strategije prevencije nastanka oralnog biofilma, poput interferencije transdukcije signala u biofilmu, modifikacije površine zubi, zamjena potencijalno patogenih s genetski modificiranim, manje virulentnim mikroorganizmima, te imunizacija, tek su početak nastojanja kontrole oralnog biofilma (34). Koja će od ovih strategija biti uspješna u prevenciji i kontroli oralnog biofilma pokazat će budućnost.

KRONIČNI OTITIS MEDIA

Nakon obične prehlade, otitis media (OM) ili upala srednjeg uha, najčešći je razlog posjeta liječniku u dječjoj dobi. Do svoje treće godine života, gotovo 75% dječje populacije doživjet će najmanje jednu akutnu epizodu OM-a. Kronični OM dijeli se u dva podtipa - rekurentni (ROM) i eksudativni otitis media (eng. *otitis media with effusion*, OME) (43, 44). Dijagnoza rekurentnog OM-a postavlja se nakon tri ili više epizoda OM-a, tijekom šest mjeseci, između kojih nema kliničkih znakova bolesti (43, 44), a eksudativnog, ukoliko sekrecija perzistira duže od tri mjeseca (43). Kronični OM najčešći je uzrok provodnog oštećenja sluha u dječjoj dobi, što može imati za posljedicu otežan razvoj govora, a potom i socijalizacije djeteta (44). Primjena antimikrobnih lijekova u liječenju kroničnog OM-a, vrlo često rezultira terapijskim neuspjehom. Ukoliko eksudat u srednjem uhu perzistira dulje od šest tjedana, kirurškim se zahvatom u bubnjište postavlja cjevčica za kontinuiranu drenažu. Dugo vremena kronični OM smatrao se isključivo upalnim procesom usmjerenim spram zaostalih bakterijskih metabolita, a eksudat sterilnim (45). Tek od 1958. godine, otkrićem bakterija u eksudatu (43), patogeneza kroničnog OM-a objašnjava se bakterijskom infekcijom (46). Klasičnim metodama kultivacije u aspiratu eksudata srednjeg uha, tek u 20-40% slučajeva, može se dokazati bakterijski uzročnik kroničnog OM-a (43). Prema učestalosti, to su bakterije *Haemophilus influenzae* (8-20%), *Streptococcus pneumoniae* (4-10%) i *Moraxella catarrhalis* (2-8%), te manje zastupljeni patogeni, poput bakterija *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* i *Pseudomonas aeruginosa* (43, 46). Primjena visokoosjetljivih tehnika molekularne biologije, kao što je reakcija lančane polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), u detekciji bakterijske DNK tri najčešća patogena u aspiratu eksudata, rezultirala je pozitivnim nalazom u 80% slučajeva kroničnog OM-a (43, 44). Isprva velika razlika u detekciji uzročnika kroničnog OM-a klasičnim i PCR metodama, objašnjavala se činjenicom da

početnice (engl. *primer*) korištene u PCR tehnologiji umnožavaju male bakterijske DNK fragmente, koji ne moraju nužno značiti prisutnost viabilnih mikroorganizama, već predstavljaju samo intaktne fragmente DNK uništenih bakterija ili ostatke patogena u uzorku (43, 47, 48). Ubrzo su uslijedila istraživanja koja su to opovrgla. Post i suradnici dokazali su, na animalnom modelu OM, da se pročišćena bakterijska DNK, te DNK topline inaktiviranih bakterija ne može detektirati dulje od tri dana u eksudatu bubnjišta (49). U istom je istraživanju uočeno da ubrzo, nakon primjene antimikrobnih lijekova, više nije moguće dokazati prisutnost uzročnika klasičnim metodama kultivacije, no PCR tehnologijom DNK patogena u uzorku može se detektirati i do tri tjedna nakon terapije (49). Sljedeći korak u istraživanjima bio je dokazivanje prisutnosti uzročnika u uzorcima. To je ostvareno detekcijom bakterijske glasničke ribonukleinske kiseline (mRNK) bakterije *H. influenzae* u uzorcima eksudata bubnjišta bolesnika s dijagnozom OME (50). Imajući na umu da je mRNK uzročnika infekcije molekula, čiji se životni vijek mjeri u sekundama i minutama, te da se sintetizira isključivo u intaktnom mikroorganizmu, zaključeno je kako se u uzorku nalazi metabolički aktivan patogen (50). Nemogućnost uzgoja uzročnika klasičnim metodama kultivacije, te rezistencija pri primjeni antimikrobnih lijekova, rezultirala je postavljanjem hipoteze o bakterijskom biofilmu kao mogućem etiološkom faktoru u kroničnom OM-u. Koncept mukoznog biofilma zaživio je tek vizualizacijom sesilne zajednice na sluznici srednjeg uha, prvo na animalnim modelima (45, 51), a potom i na bioplatima sluznice djece s kroničnim OM-om (44). Istraživački tim američkog Centra za genomske znanosti (*Center for Genomic Sciences*, Pittsburgh, Pennsylvania), 2001. i 2002. godine, primjenom skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM), detektirao je prisutnost bakterijskog biofilma na sluznici srednjeg uha, u prvom animalnom modelu, upotrijebivši u pokusu činčile (45, 51). Skenirajući uzorke elektronskim mikroskopom, pojava prvih mikrokolonija zamijećena je već 24 sata nakon indukcije eksperimentalnog OM-a, injiciranjem bakterije *H.*

influenzae u bubnjište činčila (45). Prisutnost biofilma detektirala se i 21. dan nakon inokulacije, a viabilnost bakterija, unutar biofilma, potvrdila primjenom CLSM-a i diferencijalnih vitalnih boja (45). Ubrzo je detektirano stvaranje biofilma, na životinjskom modelu, i pri injiciranju bakterije *P. aeruginosa* u bubnjište makaki majmuna (52). Nakon studija na animalnim modelima, 2006. godine, primjenom CLSM-a, dokazan je mukozni biofilm u 46 od 50 biopsijskih uzoraka sluznice srednjeg uha, djece s OME-om i rekurentnim OM-om (44). To je bio ključni dokaz da kronična infekcija srednjeg uha nije rezultat sterilnog upalnog procesa, već indolentne bakterijske infekcije, te da se neuspjeh antimikrobne terapije i obrane imunološkog sustava domaćina, može objasniti postojanjem biofilma u patogenezi ove bolesti.

KRONIČNA PLUĆNA INFЕКЦИЈА U BOLESNIKA S CISTIČNOM FIBROZOM

Cistična fibroza (CF) je kronična, genetski uvjetovana, bolest donjeg respiratornog sustava. Godine 1989. otkriven je gen za cističnu fibrozu, a njegov produkt označen je kraticom CFTR (regulatorni protein transmembranskog prijenosa u cističnoj fibrozi). Ovaj regulatorni protein djeluje kao kloridni kanal u epitelnim stanicama respiratornog sustava. U bolesnika oboljelih od cistične fibroze, izrazito je oštećen transport kloridnih iona, što za posljedicu ima dehidraciju i zgušnjavanje sluzi koja normalno prekriva respiratorni epitel, te oštećenje mukocilijarnog sustava koji pomaže u odstranjivanju inhaliranih čestica. Oštećenje ovog primarnog neupalnog obrambenog mehanizma, dovodi do začepjenja malih dišnih puteva hiperviskoznom sluzi, sekundarne akutne ili kronične bakterijske infekcije, te aktivacije upalnog obrambenog mehanizma pluća (53, 54). U slučaju perzistencije infekcije, aktivacija PMN i oslobađanje njihove DNA, doprinosi viskoznosti sekreta u dišnim putevima, a stvaranje IgG protutijela rezultira nastankom imunokompleksa, koji oštećuju plućno tkivo (53, 54). U najranijoj životnoj dobi, u ovih bolesnika, kao prvi kolonizatori dišnih puteva, dominiraju sojevi bakterija *S. aureus* i *H. influenzae* koji se,

uz oštećeni mukocilijarni klirens, te povećanu ekspresiju receptora za bakterije na površini epitelnih stanica, smatraju predisponirajućim faktorima za kolonizaciju sojevima *P. aeruginosa* (3, 55). Prevalencija kolonizacije ovim oportunističkim patogenom, kod bolesnika odrasle dobi, gotovo je 80% (55). Dišni sustav, sinusi, te probavni trakt (pretpostavlja se uslijed gutanja sputuma), inicijalno se koloniziraju nemukoidnim sojevima *P. aeruginosa*, koji se tipično nalaze u okolišu (55). Interferencijom faktora virulencije (posebno toksina elastaze i alkalne proteaze) bakterije *P. aeruginosa* s nespecifičnom i specifičnom imunološkom obranom domaćina, početna intermitentna prelazi u perzistentnu kolonizaciju (55). Tijekom perzistentne *P. aeruginosa* kolonizacije, na bakterije djeluju dehidrirani i visokoosmolarni mikrookoliš u dišnom sustavu, te slobodni radikali kisika, nastali uslijed PMN-odgovora na kolonizaciju, što rezultira promjenom nemukoidnog fenotipa sojeva u mukoidni, uslijed prekomjerne produkcije alginata (53-56). Alginat, nerazgranati, linearni egzopolisaharid, koji se sastoji od monomera manuronske i guluronske kiseline, glavna je komponenta matriksa mikrokolonija koje *P. aeruginosa* stvara u dišnim putevima, te jedini antigen ovog patogena, koji se izravno povezuje s lošom kliničkom prognozom kod ovih bolesnika (53, 55). Tranzicija sojeva u mukoidni fenotip povezuje se s indukcijom transkripcije *algC*, ključnog gena za biosintezu alginata, te inaktivacijskom mutacijom *mucA* gena, koji kodira antisigma faktor *algT* gena (1, 56). Posljedica mutacije *mucA* gena jeste porast razine sigma faktora, produkta *algT* gena, koji, za sada, nepoznatim mehanizmom, utječe na regulaciju sinteze flagela, što rezultira izostankom pokretljivosti bakterije (1, 56). Pojava mukoidnog fenotipa korelira s povećanim stvaranjem protutijela na gotovo sve antigene (uključujući i alginat) i toksine *P. aeruginosa*, te lošom kliničkom prognozom, što se povezuje s kroničnom upalnom reakcijom u kojoj dominiraju PMN, aktivacija komplementa i lokalna produkcija proupalnih citokina, te stvaranje imunokompleksa u kojima je glavni antigen lipopolisaharid (LPS) bakteri-

jske stijenke (53, 55). U prilog hipotezi da kronični endobronhijolitis, u bolesnika s CF-om, uzrokuje bakterija *P. aeruginosa*, koja stvara biofilm, govore elektronsko-mikroskopski prikazi mikrokolonija u sputumu bolesnika i uzorcima plućnog tkiva, uzetim prigodom autopsije (53, 56), te detekcija homoserin-laktonskih signalnih molekula u sputumu bolesnika (58). U proteklih desetak godina, bakterija *P. aeruginosa* postala je ogledni mikroorganizam za istraživanje biofilma i uočeno je kako formiranje biofilma varira s obzirom na raspoložive nutritivne izvore, te uvjete okoliša. Iako je model heterogenog biofilma trenutno prihvaćen kao model nastanka *P. aeruginosa* biofilma, sve je više istraživanja koja upućuju na potrebu nadopune ovog modela (58). Prema navedenom modelu, koji je uočen pri korištenju glukoze kao izvora ugljika, u adherenciji bakterija i stvaranju pojedinačnog sloja bakterija sudjeluju flagele, dok tip IV fimbrije omogućavaju kretanje bakterije po površini, te agregaciju stanica i stvaranje mikrokolonija, a na stvaranje gljivolikih višestaničnih zajednica, u procesu maturacije, utječe detekcija kvoruma (58). Korištenjem citrata, kao izvora ugljika, uočeno je da *P. aeruginosa* stvara ravan biofilm, koji se bitno razlikuje od prethodno opisanog heterogenog modela (58). U ovom alternativnom modelu, flagele nisu sudjelovale u adherenciji bakterija za supstrat, mikrokolonije su nastale klonalnim rastom jedne stanice, a kretanje posredovano tip IV fimbrijama rezultiralo je širenjem bakterija duž supstrata, uz izostanak većih mikrokolonijskih struktura (58). Nedavno je iz soja 57RP *P. aeruginosa* biofilma, izolirana i visokoadherentna, mala fenotipska varijanta, sa prekomjerno izraženim fimbrijama, koja ima povećane sposobnosti stvaranja biofilma (59). Premda se u kronično inficiranih CF bolesnika susreće jedan ili tek nekoliko genotipova *P. aeruginosa*, značajne fenotipske varijabilnosti izolata rezultat su učestalih promjena okoliša u plućima bolesnika, te odgovora ove bakterije na te promjene fenotipskom adaptacijom (59, 60). Otkrivanje mehanizama koji omogućuju fenotipsku adaptaciju, te daljnje istraživanje stvaranja biofilma u kronično inficiranih bolesnika, pove-

zuje se s uspješnijom kontrolom i eradikacijom infekcije u oboljelih. U kronično inficiranih bolesnika s CF-om, trajna eradikacija *P. aeruginosa* gotovo je nedostižan cilj, pa su potrebne druge kratkotrajne i prijelazne terapijske mjere s ciljem smanjenja broja bakterija u sputumu, poboljšanja funkcije pluća, te odgađanja nepovratnih oštećenja plućnog tkiva (55). Dugotrajna perzistencija *P. aeruginosa*, te rezistencija na primjenu antimikrobnih lijekova u bolesnika s CF-om, pripisuje se mutacijama bakterija i izmjeni genskog materijala koji doprinose rezistenciji na lijekove, smanjenoj djelotvornosti lijekova u anaerobnim uvjetima, te biofilm-specifičnim mehanizmima rezistencije (61). Nemogućnost trajne eradikacije i rezistencija patogena naglašavaju potrebu za prevencijom ili odgodom uspostavljanja kronične infekcije već u fazi intermitentne kolonizacije ranom i agresivnom antimikrobnom terapijom (55). Terapijske mjere, poduzete nakon inicijalnog izoliranja *P. aeruginosa*, poput inhalacija kolistina ili tobramicina, te oralne primjene ciprofloksacina, uz kohortnu izolaciju bolesnika, pokazale su se uspješnim u prevenciji i epidemiologiji kronične *P. aeruginosa* infekcije (62). Nove spoznaje rezultirale su promjenom terapijskog pristupa u kroničnoj infekciji, pa je prethodna terapija samo akutnih egzacerbacija kronične infekcije zamijenjena kroničnom supresivnom kemoterapijom kojom se nastoji smanjiti broj i aktivnost bakterije *P. aeruginosa* u plućima bolesnika s ciljem poboljšanja plućne funkcije (53). Iako mehanizam djelovanja antimikrobnih lijekova u kroničnoj infekciji povezan s biofilmom nije razjašnjen, *in vitro* se primjenom kombinacije β -laktama i aminoglikozida, najčešće korištenih antipseudomonasnih lijekova, uočilo smanjenje broja bakterija u sesilnoj zajednici na svega 20%, a pri primjeni pojedinih antibiotika u subinhibicijskim koncentracijama (subMIK), supresija stvaranja proteaze, fosfolipaze C, te alginata u *P. aeruginosa* (53, 63). Antimikrobna terapija rezultira smanjenjem prisutnosti bakterijskih antigena, a time i imunološki uzrokovanog oštećenja plućnog tkiva (53). Rezultati novijih istraživanja pokazali su djelotvornost makrolida u biofilm in-

fekcijama uzrokovanih bakterijom *P. aeruginosa*, što se povezuje s njihovom protuupalnom aktivnošću, te subMIK učinkom, poput inhibicije adherencije, pokretljivosti bakterije, te detekcije kvoruma (64-66). Istraživanjima kronične *P. aeruginosa* infekcije u bolesnika s cističnom fibrozom, nastoji se otkriti učinkovita terapija koja bi prevenirala nastanak ili omogućila uništenje biofilma u ovih bolesnika.

KRONIČNI CISTITIS

Infekcije mokraćnog sustava (IMS), nakon respiratornih, druge su po učestalosti bakterijske infekcije. Većina se ovih infekcija javlja kod mladih i zdravih žena. Gotovo 80% žena svjetske populacije, tijekom svoga života, ima najmanje jednu IMS, a 27-44% ovih bolesnica, unutar slijedećih šest mjeseci, ima i rekurentnu epizodu bolesti, unatoč antimikrobnoj terapiji (67, 68). U gotovo 80% slučajeva IMS-a kao uzročnik se izolira uropatogena *Escherichia coli* (UPEC) (68, 69). Bakterijski biofilm ima važnu ulogu u patogenezi, perzistenciji i terapiji infekcija mokraćnog sustava. Naime, stvaranje biofilma u mokraćnom sustavu povezuje se s kroničnim cistitisom, te struvitnom urolitijazom. U posljednje tri godine intenzivno se proučava povezanost progresije IMS-a u perzistentnu UPEC-induciranu infekciju, u nekoliko *in vitro* i animalnih *in vivo* modela (68, 70-72). Kao ključni faktor uspostavljanja biofilma uropatogene *E. coli* na abiotičkim površinama, u stacionarnim uvjetima i uvjetima hidrodinamičkog protoka, te luminalnoj površini mišjeg mokraćnog mjehura, smatra se FimH adhezin, koji se nalazi na vrhu tipa 1, manosa-senzitivnih fimbrija (71, 72). Ovaj adhezin veže manozilirane ostatke na integralnim membranskim proteinima, uroplakinima (UP), koji su izraženi na luminalnoj strani superficijalnih epitelnih stanica mokraćnog mjehura (70). Udruživanjem četiri poznata UP molekula (UP Ia, Ib, II i III) nastaju heksamerni prsteni, a organizacijom prstena nastaju kristalni plakovi, koji prekrivaju gotovo cijelu luminalnu površinu mokraćnog mjehura sa zadaćom očuvanja integriteta epitelne membrane, te stvar-

anja kemijski nepropusnog sloja za difuziju u epitel (70). U mišjem modelu cistitisa, primjenom skenirajućeg i transmisijskog elektronskog mikroskopa, zabilježeno je da, jedan do tri sata nakon adheriranja bakterije na površinu epitelnih stanica, dolazi do brzog prodora UPEC-a u epitelne stanice. Prodor bakterije u stanicu posredovan je FimH adhezinom koji otpočinje signalnu kaskadu u domaćinovim epitelnim stanicama, što rezultira lokaliziranim preslagivanjem aktina, te uvlačenjem adherirane bakterije u stanicu zatvaranjem membrane oko mikroorganizma (68, 70, 72). Nakon invazije u superficijalne epitelne stanice mokraćnog mjehura, UPEC se ubrzano dijeli u citoplazmi, te u narednih osam sati, stvara slabo povezane, male nakupine bakterija, koje zadržavaju tipičnu morfologiju štapića (68, 70, 71). Uspostavljanjem ovih ranih intracelularnih bakterijskih zajednica (IBZ), bakterija stvara protektivni okoliš u kojem je zaštićena od djelovanja antimikrobnih lijekova, te domaćinova imunološkog odgovora (68, 70). Šest do osam sati nakon infekcije, dolazi do dramatične fenotipske promjene IBZ-a, te rana IBZ sazrijeva u zajednicu nalik na biofilm (70, 71). Bakterije u biofilmu poprimaju kokoidni oblik i ispunjavaju cijelu superficijalnu epitelnu stanicu; brzina rasta bakterija usporava na više od jednog sata, male nakupine bakterija povezuju se u gustu organiziranu zajednicu globularnog izgleda (70, 71). U ovom stadiju, bakterije na svojoj površini imaju izražena brojna amiloidna vlakna, koja omogućavaju stvaranje individualnog odjeljka za svaku bakteriju, te površinske molekule, poput tip 1 fimbrija i antigena 43, koje doprinose interakcijama, tijekom stvaranja mikrokolonija (68, 70). Ključni proces maturacije intracelularnog biofilma, koji tvori *E. coli*, jeste sekrecija kolanske kiseline, egzopolisaharida koji stvara polisaharidni matriks oko bakterijskih stanica (68, 70). Vizualizacijom ovog stadija infekcije, na površini inficiranog mišjeg mokraćnog mjehura, uočene su brojne protruzije, nastale uslijed utjecaja mase bakterijskog biofilma na staničnu membranu superficijalnih epitelnih stanica (68, 71). Dvanaest sati nakon infekcije, kokoidne bakterije, na površini IBZ-a,

ponovo poprimaju morfologiju štapića, postaju izrazito pokretne, te se odvajaju iz bakterijskog biofilma (71). U trenutku kada stignu do ruba stanice domaćina, ove bakterije izbijaju kroz staničnu membranu, te prodiru u lumen mokraćnog mjehura procesom koji se naziva *izlijevanje* (71). Narušavanjem integriteta domaćinove stanične membrane, ubrzo se, nakon ovih pojedinačnih stanica, u lumenu mokraćnog mjehura pojavljuju bakterije iz mnogobrojnih IBZ-a, što rezultira oslobađanjem miliona UPEC, pojave bakteriurije, te širenja i kolonizacije novih superficijalnih epitelnih stanica (70, 71). U lumenu mokraćnog mjehura, bakterije, oslobođene iz biofilma, diferenciraju se u 70 µm duge filamentozne tvorbe (71). Iako je mehanizam i svrha nastanka filamenata do danas nepoznata, pretpostavlja se da, na taj način, UPEC preživljava napad imunološkog sustava domaćina dovoljno dugo da septacijom filamenata nastane nova populacija bakterija, koja započinje slijedeći ciklus invazije i stvaranja IBZ-a u do tada neinficiranim superficijalnim epitelnim stanicama (68, 71). U nekoliko slijedećih postinokulacijskih dana, bakterije prolaze kroz višestruke cikluse stvaranja IBZ-a, no, sa svakim novim ciklusom, vrijeme koje je potrebno da IBZ prođe kroz sva četiri fenotipa intracelularnog biofilma, sve je sporije i sporije (68). U konačnici se, unutar superficijalnih epitelnih stanica, uočavaju samo male nakupine štapićastih bakterija, koje ulaze u stanje mirovanja, tzv. *dormant* fazu (68). U fazi mirovanja, UPEC može perzistirati u mokraćnom mjehuru mjesecima nakon inicijalne infekcije (68). Zahvaljujući IBZ koja je nalik na biofilm, UPEC uspješno odolijeva nespecifičnom imunološkom odgovoru domaćina (70, 71). Naime, lipopolisaharidi stanične stijenke UPEC-a aktiviraju Toll-nalik receptore tipa 4 na membrani superficijalnih epitelnih stanica, što rezultira oslobađanjem upalnih citokina i masivnom infiltracijom mokraćnog mjehura polimorfonuklearnim leukocitima (PMN) (68). Iako u mokraćnom mjehuru, u fazi nastanka rane IBZ, polimorfonukleari migriraju prema inficiranim stanicama i pokušavaju prodrijeti u intracelularni biofilm, a

kasnije pokušavaju uništiti filamentozne oblike bakterija, njihovo djelovanje na UPEC je bez uspjeha (68, 71). Osim aktivacije PMN, infekcija inducira i masivnu eksfolijaciju superficijalnih epitelnih stanica, no odljuštenje stanica u lumen mokraćnog mjehura rezultira samo smanjenjem broja bakterija, a ne i uništenjem IBZ (70). Ako odolijevanju imunološkom odgovoru domaćina pridodamo i rezistenciju biofilma na antimikrobnu terapiju, jasno je da sposobnost stvaranja IBZ-a omogućuje uropatogenoj *E. coli* iznimno dugu perzistenciju u mokraćnom mjehuru, a time i mogućnost nastanka kroničnih rekurentnih infekcija (68). Nakon mišjeg modela infekcije, kojim je pokazano značenje biofilma u patogenezi IMS-a, slijedećim studijama predstoji dokazati postojanje IBZ-a u bolesnika s rekurentnim cistitisom. Uz kronični cistitis, bakterijski se biofilm povezuje i s patogeneom stuvitne uro/nefrolitijaze. Struvitni kamenci nastaju kao posljedica bakterijske IMS, te premda čine svega 10-20% svih kamenaca u mokraćnom sustavu, predstavljaju pravi izazov u liječenju, uslijed brzog rasta i rekurencije koja se javlja u gotovo 50% slučajeva ove bolesti (73). Ključni faktori virulencije bakterija, uključenih u stvaranje kamenaca, jesu produkcija metaloenzima ureaze i bakterijski egzopolisaharidi (73, 74). Enzim ureaza hidrolizira ureu, koja je u urinu prisutna u velikim količinama, pri čemu nastaje amonijak i ugljični dioksid. Tako stvoreni amonijak podiže pH urina, uslijed čega topivi ioni magnezija i kalcija precipitiraju, te nastaju kamenci koji sadrže magnezij amonij fosfat (struvit) i kalcij fosfat (apatit) (74). Bakterijski egzopolisaharidi doprinose stvaranju kamenaca ubrzavanjem supersaturacije i kristalizacije iona kalcija i magnezija elektrostatskim interakcijama, te vezivanjem ovih iona za anionske grupe na njihovoj površini (73). Uzročnik koji, uz ostale, posjeduje oba navedena faktora virulencije i koji se najčešće povezuje s nastankom stuvitnih kamenaca jeste bakterija *Proteus mirabilis*. Pretpostavljalo se da, u procesu nukleacije kristala i nastanka kamenaca, ključnu ulogu ima sposobnost bakterija da stvaraju biofilm, pri čemu bi izvanstanični polisaharidni matriks biofilma promovirao

vezivanje kristala (75). To je potaklo istraživače da u studijama povezanosti bakterija sa struvitnim kamencima, primjene morfološke tehnike moderne mikrobiologije, poput skenirajućeg i transmisijskog elektronskog mikroskopa. Ovim je tehnikama tako dokazana prisutnost bakterija u obliku mikrokolonija, unutar glikokaliksa intersticija, jezgre i površine struvitnih kamenaca, kirurški odstranjenih iz bolesnika (76), te infekcijom induciranih u animalnim modelima (štakor, miš) (74, 77). Odolijevanje djelovanju antimikrobnih lijekova i obrani imunološkog sustava domaćina objašnjava se pozicioniranjem bakterija duboko u matriksu kamenca, odnosno stvaranjem sesilne zajednice, ukoliko se nalaze na njegovoj površini (74). Sve to doprinosi perzistenciji infekcije, daljnjem rastu struvitnih kamenaca, čestim rekurentnim infekcijama, te teškim oštećenjima, osobito bubrega. Danas se u terapiji struvitnih kamenaca upotrebljava mrvljenje kamenaca udarnim valovima ili perkutana nefrolitotomija, odnosno ureteroskopijska, no u budućnosti se očekuje primjena lijekova koji penetriraju u biofilm kamenaca i uništavaju ga, te primjena inhibitora ureaze (78).

KRONIČNI PROSTATITIS

Prostatitis, upala prostate, najčešći je urološki problem kod muškaraca mlađih od 50 godina, te treći po učestalosti klinički entitet kod muškaraca starije životne dobi. Primjenom indeksa simptoma kroničnog prostatitisa (engl. *Chronic Prostatitis Symptom Index*, CPSI), razvijenog od strane američkog Nacionalnog instituta za zdravlje (NIH), kod muškaraca, u dobi od 20. do 74. godine, nađena je 10% prevalencija simptoma prostatitisa (79). Sve do 1995. godine, kada je u Bethesda, pod pokroviteljstvom NIH-a, donešena nova klasifikacija (80), prostatitis se klasificirao u četiri klinička entiteta: akutni i kronični bakterijski prostatitis, nebakterijski prostatitis i prostatodinija. U novoj su klasifikaciji prve dvije kategorije ostale iste, no preostala dva klinička entiteta objedinjena su u kategoriju III – kronični abakterijski prostatitis/kronična bol u zdjelici (81). Ova kategorija, s obzirom na

prisutnost ili odsutnost upalnih stanica u uzorcima specifičnim za prostatu (ekspimat prostate i prvi mlaz urina nakon masaže prostate) (80), dodatno se dijeli na upalnu (IIIA) i neupalnu (IIIB) potkategoriju. Novost spram stare klasifikacije jeste i kategorija IV, u koju ulaze bolesnici bez simptoma i dijagnoze prostatitisa, a kod kojih je biopsijom prostate ili u specifičnim uzorcima detektirana prisutnost upale i/ili mikroorganizama (80). Kronični bakterijski prostatitis karakteriziraju rekurentne infekcije mokraćnog sustava, s nespecifičnim simptomima između simptomatskih infekcija, te perzistencija bakterija u prostati usprkos višestruko provedenim antimikrobnim terapijama (82). Najčešći uzročnici prostatitisa jesu dobro poznati gram-negativni uropatogeni poput bakterija *E. coli* (u gotovo 80% slučajeva), *Klebsiella* sp., *Serratia* sp., *Enterobacter* sp. i *P. aeruginosa*. Gram-pozitivne bakterije, izuzev bakterije *Enterococcus faecalis*, koja se smatra uzročnikom kroničnog bakterijskog prostatitisa, imaju vrlo upitnu ulogu u mikrobnj etilogiji prostatitisa (80). Kada uzročnici uđu u kanaliće i acinuse prostate, ascenzijom iz mokraćne cijevi i/ili povratom urina u prostatične kanaliće (75), ondje se ubrzano razmnožavaju i izazivaju akutni upalni odgovor domaćina. Vitalne i umirujuće bakterije, i stanice akutne upale, deskvamirane epitelne stanice i stanični detritus, ispunjavaju kanaliće, no sve dok je infekcija u akutnoj fazi, odgovarajućom antimikrobnom terapijom, moguće je eradicirati planktonske uzročnike, te suzbiti upalni proces (75). Pri subakutnoj upali ili perzistenciji bakterija unutar opstruiranih prostatičnih kanalića, bakterije mogu adherirati na epitel stijenki kanalića i ubrzo stvoriti sporadične mikrokolonije biofilma, što može dovesti do perzistentne stimulacije imunološkog sustava i posljedično kronične upale (75). Premda je klasična kvantitativna kultivacija uzoraka urina i ekspimata prostate ključna za dijagnozu kroničnog prostatitisa, kada se radi o mikrobiološkoj dijagnostici kliničkih entiteta u kategoriji III i IV, to je onda pravi klinički izazov (75). Neuspjeh detekcije bakterija kultivacijom u ovih bolesnika objašnjava se prisutnošću/odsutnošću inhibitornih tvari u sekretima prostate,

poput visoke koncentracije cinka i prostatičnog antibakterijskog faktora, te planktonskih bakterija u uzorcima (80, 83). Naime, planktonske se stanice teško odvajaju od sesilne zajednice i bivaju eradikirane primjenom empirijske antimikrobne terapije (80). Da antimikrobna terapija ne utječe na biofilm, te da bakterijske stanice perzistiraju u prostati, ubrzo je potvrđeno detekcijom mikroorganizama u bioptičkim uzorcima prostate u bolesnika, te elektronsko-mikroskopskim prikazom egzopolisaharidom prekrivenih mikrokolonija čvrsto adheriranih bakterija za stijenke kanalića i acinusa (84). Novi koncept mikrobiološke etiologije kroničnog prostatitisa rezultirao je primjenom molekularnih tehnika u studijama prostatitisa. Primjenom PCR metode, detektirana je prisutnost 16S rRNA bakterija u 77% bioptičkih uzoraka prostate (83), a potom u 65% uzoraka eksprimata prostate u oboljelih od kroničnog prostatitisa (85). Ubrzo se postavilo pitanje jesu li detektirani mikroorganizmi doista i uzročnici kroničnog prostatitisa. Prvi dokaz dobiven je usporedbom PCR rezultata dobivenih iz uzoraka prostatičnog tkiva zdravih donora prostate i bolesnika koji su bili podvrgnuti prostatektomiji (86). Dok su u grupi zdravih donora, u svim uzorcima PCR-a, rezultati bili negativni, te znakovi upale odsutni, u grupi oboljelih od karinoma prostate i benigne hipertrofije prostate (BHP), u 70% uzoraka, dokazana je prisutnost upale i dobiven pozitivan PCR rezultat. Imajući na umu da gotovo 90% bolesnika s BHP-om ima prostatitis (86), te da prisutnost upalnih stanica u uzorku bioptata prostate dobro korelira s detekcijom bakterijskih genskih sekvenci (83), može se zaključiti da su detektirani mikroorganizmi ujedno i uzročnici prostatitisa. Bakterijski biofilm utječe i na rezultate primjene antimikrobne terapije u sindromu kroničnog prostatitisa. Iako se u početku smatralo da kronični upalni proces u prostati mijenja farmakokinetika svojstva antimikrobnih lijekova (87) i utječe na terapijski uspjeh, studijama na animalnom modelu to nije potvrđeno. Danas se nemogućnost eradikacije bakterija u kroničnom prostatitisu objašnjava sesilnim načinom života bakterija u prostati, te intrizičnom rezistencijom biofilma (75). Primje-

na molekularnih tehnika u detekciji i elektronskog mikroskopa u vizualizaciji, omogućili su povezivanje biofilma s etiologijom kroničnog prostatitisa, a rezultati daljnjih istraživanja trebali bi unaprijediti terapijski pristup ovom sindromu.

KRONIČNE INFEKCIJE RANA

Vrlo općenito, rane, prema njihovoj etiologiji, dijele se na akutne i kronične. Dok akutne rane uzrokuje eksterno oštećenje intaktne kože, kronične rane nastaju endogenim mehanizmima koji su povezani s predisponirajućim stanjima, poput metaboličke bolesti ili oštećenja arterijskog, odnosno venskog protoka, uslijed čega dolazi do oštećenja integriteta dermalnog i epidermalnog tkiva (88). Osim s kolonizacijom, prisutnost bakterija u akutnim i kroničnim ranama, povezuje se s razvojem upale, a time i procesom cijeljenja, invazivnim infekcijama i sepsom, zatajenjem organa, pa i smrtnim ishodom. Premda se u brojnim studijama mikroorganizmi, poput bakterija *S. aureus*, *P. aeruginosa*, te β -hemolitički streptokoki, najčešće povezuju s odgođenim cijeljenjem i infekcijom rana, u većini rana nalazi se polimikrobna, aerobna i anaerobna flora (88, 89). Zbog perzistencije infekcije, te rezistencije na sistemske i topičke antimikrobne lijekove, posljednjih godina pretpostavlja se kako bakterije koje koloniziraju kronične rane tvore sesilnu zajednicu, odnosno biofilm (90, 91). Sklonost bakterijskoj kontaminaciji, dostupnost supstrata, te izrazito velika površina koja podržava adherenciju bakterija, čini kronične rane gotovo idealnim okolišom za stvaranje biofilma (90). No, direktni dokazi koji bi podržali značenje biofilma u patogenezi kroničnih rana za sada su rijetki. Prvi pokušaji vizualizacije formiranja biofilma u kroničnim ranama temeljili su se na primjeni modificirane Kongo-red tehnike bojanja za prikaz polisaharida. Primjenom navedene tehnike u *in vitro* modelu *P. aeruginosa* biofilma, uočeno je kako je bakterijama, iz uzoraka rana ljudi s opeklinama, dovoljno tek sedam do deset sati za stvaranje zrelog biofilma (92). Nakon *in vitro* modela, ista grupa autora dokazala

je postojanje biofilma i u ranama svinjskog *in vivo* modela (90). Uslijedio je i prikaz *S. aureus* biofilma u akutnim ranama pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije (93), a naposljetku istraživači američkog Centra za inženjering biofilma Sveučilišta u Montani dokazali su i prisutnost biofilma u 60% uzoraka kroničnih rana (94). Upravo se stvaranje biofilma u kroničnim ranama smatra najboljim objašnjenjem zatajenja procesa cijeljenja takvih rana. Na cijeljenje rane i tijekom infekcije utječe bakterijska sposobnost stvaranja stabilne, sesilne zajednice, te sposobnost domaćinova imunološkog sustava da kontrolira infekciju (91). Zajednice mikroorganizama mogu na proces cijeljenja utjecati direktno, produkcijom destruktivnih enzima i toksina, ili indirektno, promoviranjem stanja kronične upale u kojem oslobađanje slobodnih radikala i brojnih litičkih enzima negativno utječe na proliferaciju stanica, a time i na proces cijeljenja rane (91). Nadalje, djelovanje biofilma na proces cijeljenja objašnjava se njegovom smanjenom osjetljivošću na imunološki obrambeni odgovor domaćina. Poznato je da matriks biofilma inhibira kemo-taksiju i degranulaciju PMN-a i makrofaga, te da PMN ne uspijevaju fagocitirati bakterije unutar biofilma. To PMN potiče na oslobađanje velike količine proupalnih enzima i citokina, te metaloproteaza matriksa (95, 96). Posljedice povišene razine endogenih metaloproteaza matriksa, te nestanka njihovih prirodnih inaktivatora u kroničnim ranama, jesu mnogobrojne. Proteolitičkim djelovanjem ovih enzima smanjuje se razina faktora rasta i citokina koji reguliraju pokretanje i rast stanica poput keratinocita, fibroblasta i stanica endotela, a dolazi i do nekontrolirane destrukcije ekstracelularnog matriksa koji, osim što koži daje snagu i otpornost, čini osnovu za prerastanje epidermisa i rast krvnih žila i živaca (96). Kako svaki od navedenih faktora sudjeluje u procesu cijeljenja u točno određenom trenutku, izostanak normalna slijeda događaja rezultira zaustavljanjem kronične rane u fazi upale i stvaranja granulacijskog tkiva. Dokazana prisutnost biofilma u kroničnim ranama i njegova povezanost s procesom cijeljenja motivirala je istraživače na razmatranje novih strate-

gija kontrole biofilma. Jedna od ideja temelji se na prevenciji razvoja bakterijskog biofilma posredstvom komponente nespecifične imunosti – laktoferina (97, 98). Laktoferin je glikoprotein sa sposobnošću vezivanja željeza, koji, pri koncentracijama nižim od onih potrebnih za uništenje ili prevenciju rasta bakterija, stimulira specijalni oblik kretanja bakterije na površini supstrata, te na taj način onemogućuje adherenciju i stvaranje mikrokolonija i nakupljanje (97, 98). Stoga se pretpostavlja da bi preparati laktoferina mogli razoriti već postojeći biofilm, što bi utjecalo na zaštitu kronične rane od infekcije. Druga mogućnost kontrole stvaranja biofilma jeste interferencija s detekcijom kvoruma. Poznato je da gram-negativne bakterije, kao signalne molekule, koriste AHL, a gram-pozitivne cikličke peptide (4). Proučavanjem strukture ovih signalnih molekula, te stvaranja, širenja i primanja signala, istraživači su, u potrazi za mogućnostima inhibicije detekcije kvoruma, pronašli brojne molekule s agonističkim, antagonističkim ili enzimskim djelovanjem na AHL, kao što su supstance nekih biljaka i gljiva koje interferiraju s AHL-posredovanom komunikacijom, te halogenirane tvari furanona koje utječu na ekspresiju gena koji kontroliraju detekciju kvoruma i povećavaju osjetljivost biofilma na antimikrobne lijekove (4). Smatra se kako farmakološka inhibicija detekcije kvoruma pruža novu nadu u kontroli bakterijskog biofilma brojnih infekcija, pa tako i one u kroničnim ranama.

Svakako, nužni su novi terapijski pristupi koji bi omogućili uspješno liječenje biofilm-infekcija. Potencijalna terapija, uz primjenu inhibitora detekcije kvoruma i činitelja virulencije bakterija, uključuje i enzimsku razgradnju ili oštećenje izvanstaničnog matriksa biofilma, što bi za posljedicu imalo disperziju biofilma, a time i smanjenje njegove rezistencije na djelovanje imunološkog sustava domaćina i antimikrobnih lijekova (99). Johansen i suradnici dokazali su baktericidnu aktivnost oksidoreduktaza, te učinak primjene enzima koji hidroliziraju polisaharide na uništenje bakterijskog biofilma koji tvore bakterije *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* i *Pseudomonas fluorescens* sa abiotičkih

supstrata (100). Nedavno je francuska grupa istraživača uočila uspjeh u primjeni disperzina B, enzima koji hidrolizira poli-N-acetilglukozamin, u kombinaciji s proteazama u eradikaciji biofilma različitih stafilokoknih sojeva (101). Liječenje

kroničnih infekcija mora počivati na spoznajama o karakteristikama, organizaciji i funkcioniranju biofilma, kao cjelovite multicelularne strukture u određenoj kroničnoj infekciji, a ne biti usmjereno na pojedinačne mikroorganizme kao do sada.

LITERATURA

1. Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64:847-67.
2. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:881-90.
3. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:167-93.
4. Hentzer M, Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 2003; 112:1300-7.
5. Greenberg EP. Bacterial communication and group behavior. *J Clin Invest* 2003; 112:1288-90.
6. Marić S, Vraneš J. Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Period Biol* 2007; 109:115-21.
7. Gieseke A, Purkhold U, Wagner M, Amann R, Schramm A. Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:1351-62.
8. Macedo AJ, Kuhlicke U, Neu TR, Timmis KN, Abraham WR. Three stages of a biofilm community developing at the liquid-liquid interface between polychlorinated biphenyls and water. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:7301-9.
9. Chenier MR, Beaumier D, Roy R, Driscoll BT, Lawrence JR, Greer CW. Influence of nutrients, hexadecane, and temporal variations on nitrification and exopolysaccharide composition of river biofilms. *Can J Microbiol* 2006; 52:786-97.
10. Chenier MR, Beaumier D, Fortin N, Roy R, Driscoll BT, Lawrence JR, Greer CW. Influence of nutrient inputs, hexadecane, and temporal variations on denitrification and community composition of river biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:575-84.
11. Satoh H, Yamakawa T, Kindaichi T, Ito T, Okabe S. Community structures and activities of nitrifying and denitrifying bacteria in industrial wastewater-treating biofilms. *Biotechnol Bioeng* 2006; 94:762-72.
12. Vinarov A, Robysheva Z, Sokolov D, Smirnov V. Examination of the long-term process for purifying gaseous discharges in industrial biofilter. *Commun Agric Appl Biol Sci* 2003; 68:211-3.
13. Valenzuela L, Chi A, Beard S, Orell A, Guiliani N, Shabanovitz J, Hunt DF, Jerez CA. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnol Adv* 2006; 24:197-211.
14. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 2002; 66:86-92.
15. Coetser SE, Cloete TE. Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. *Crit Rev Microbiol* 2005; 31:213-32.
16. Neria-Gonzales I, Wang ET, Ramirez F, Romero JM, Hernandez-Rodriguez C. Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico. *Anaerobe* 2006; 12:122-33.
17. Smith JL, Fratamico PM, Novak JS. Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *J Food Prot* 2004; 67:1053-70.
18. Ekman J, Kosonen M, Jokela S, Kolari M, Korhonen P, Salkinoja-Salonen M. Detection and quantification of colored deposit-forming *Meiothermus* spp. in paper industry processes and end products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2007; 34:203-11.
19. Beech IB, Sunner JA, Arciola CR, Cristiani P. Microbially-influenced corrosion: damage to prostheses, delight for bacteria. *Int J Artif Organs* 2004; 29:443-52.
20. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9:34-9.
21. Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)* 2005; 70:267-74.
22. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358:135-8.
23. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:999-1007.
24. Xu KD, McFeters GA, Stewart PS. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology* 2000; 146:547-9.
25. Ehrlich GD, Hu FZ, Shen K, Stoodley P, Post JC. Bacterial plurality as a general mechanism driving persistence in chronic infections. *Clin Orthop Relat Res* 2005; 437:20-4.

26. Roberts ME, Stewart PS. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology* 2005; 151:75-80.
27. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5:48-56.
28. Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 2003; 112:1466-77.
29. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284:1318-22.
30. Prakash B, Veeregowda BM, Krishnappa G. Biofilms: a survival strategy of bacteria. *Curr Sci* 2003; 85:1299-307.
31. Jensen ET, Kharazmi A, Lam K, Costerton JW, Hoiby N. Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas aeruginosa* grown in biofilms. *Infect Immun* 1990; 58:2383-5.
32. Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW, Stoodley P. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun* 2002; 70:6339-45.
33. Cerca N, Jefferson KK, Oliveira R, Pier GB, Azeredo J. Comparative antibody-mediated phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a biofilm or in the planktonic state. *Infect Immun* 2006; 74:4849-55.
34. Scheie AA, Petersen FC. The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases? *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15:4-12.
35. Preshaw PM, Seymour RA, Heasman PA. Current concepts in periodontal pathogenesis. *Dent Update* 2004; 31:570-2, 574-8.
36. Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig* 2003; 7:181-8.
37. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 2004; 38:204-11.
38. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH i sur. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:2837-48.
39. Palmer RJ Jr, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE. Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol* 2003; 185:3400-9.
40. Kolenbrander PE, Ganeshkumar N, Cassels FJ, Hughes CV. Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. *FASEB J* 1993; 7:406-13.
41. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and generic systems. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54:413-37.
42. Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3944-55.
43. Pereira MB, Pereira MR, Cantarelli V, Costa SS. Prevalence of bacteria in children with otitis media with effusion. *J Pediatr (Rio J)* 2004; 80:41-8.
44. Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, Nistico L, Nguyen D, Hayes J, Forbes M, Greenberg DP, Dice B, Burrows A, Wackym PA, Stoodley P, Post JC, Ehrlich GD, Kerschner JE. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA* 2006; 296:202-11.
45. Ehrlich GD, Veeh R, Wang X, Costerton JW, Hayes JD, Hu FZ, Daigle BJ, Ehrlich MD, Post JC. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA* 2002; 287:1710-5.
46. Park CW, Han JH, Jeong JH, Cho SH, Kang MJ, Tae K, Lee SH. Detection rates of bacteria in chronic otitis media with effusion in children. *J Korean Med Sci* 2004; 19:735-8.
47. Cantekin EI. Bacterial DNA fragments in otitis media with effusion. *JAMA* 1996; 275:186.
48. Weckx LLM. Presence or absence of bacteria in otitis media with effusion? *J Pediatr* 2004; 80:5-6.
49. Post JC, Aul JJ, White GJ, Wadowsky RM, Zavoral T, Tabari R, Kerber B, Doyle WJ, Ehrlich GD. PCR-based detection of bacterial DNA after antimicrobial treatment is indicative of persistent, viable bacteria in the chinchilla model of otitis media. *Am J Otolaryngol* 1996; 17:106-11.
50. Rayner MG, Zhang Y, Gorry MC, Chen Y, Post JC, Ehrlich GD. Evidence of bacterial metabolic activity in culture-negative otitis media with effusion. *JAMA* 1998; 279:296-9.
51. Post JC. Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *Laryngoscope* 2001; 111:2083-94.
52. Dohar JE, Hebda PA, Veeh R, Awad M, Costerton JW, Hayes J, Ehrlich GD. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in a nonhuman primate model of chronic suppurative otitis media. *Laryngoscope* 2005; 115:1469-72.
53. Hoiby N, Krogh Johansen H, Moser C, Song Z, Ciofu O, Kharazmi A. *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes Infect* 2001; 3:23-35.

54. Tješić-Drinković D, Tješić-Drinković D, Vraneš J, Votava-Raić A, Kelečić J, Gagro A. Imunološki aspekt plućne bolesti u cističnoj fibrozi. Paediatr Croat 2005; (Supl 1):139-44.
55. Hoiby N. *Pseudomonas* in cystic fibrosis: past, present, future. 1998. http://www.ecfsoc.org/pa_review/nh_lect.html (Last accessed 16 April 2007.)
56. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M, Parsek MR. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. J Bacteriol 2001;183:5395-401.
57. Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. Nature 2000; 407:762-4.
58. Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jorgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. Mol Microbiol 2003; 48:1511-24.
59. Haussler S, Ziegle I, Lottel A, von Gotz, Rohde M, Wehmhohner D, Saravanamuthu S, Tummler B, Steinmetz I. Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. J Med Microbiol 2003; 52:295-301.
60. Vranes J, Bedenic B, Tjesic-Drinkovic D, Jarza-Davila N. In vitro effect of subMICs of antibiotics on the antigenic structure of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. Clin Microbiol Infect 2005; 11(Suppl. 2):394-5.
61. Hill D, Rose B, Pajkos A, Robinson M, Bye P, Bell S, Elkins M, Thompson B, MacLeod C, Aaron SD, Harbur C. Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. J Clin Microbiol 2005; 43:5085-90.
62. Frederiksen B, Koch C, Hoiby N. Changing epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection in Danish cystic fibrosis patients (1974-1995). Pediatr Pulmonol 1999; 28:159-66.
63. Vraneš J. Effect of subminimal inhibitory concentrations of azithromycin on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to polystyrene. J Chemother 2000; 12:280-85.
64. Hoiby N. New antimicrobials in the management of cystic fibrosis. J Antimicrob Chemother 2002; 49:235-8.
65. Schultz MJ. Macrolide activities beyond their antimicrobial effects: macrolides in diffuse pan-bronchiolitis and cystic fibrosis. J Antimicrob Chemother 2004; 54:21-8.
66. Vraneš J, Tješić-Drinković D, Žulj I, Kružić V, Turković B, Marić S. *In vitro* adherence ability of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. Coll Antropol 2004; 28:675-80.
67. Gupta K, Stamm WE. Urinary tract infections. 2005. <http://www.medscape.com/viewarticle/505095> (6 March 2007.)
68. Anderson GG, Dodson KW, Hooton TM, Hultgren SJ. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. Trends Microbiol 2004;12:424-30.
69. Vraneš J, Kružić V, Schoenwald S. Virulence characteristics of *Escherichia coli* strains causing asymptomatic bacteriuria. Infection 2003; 31:216-20.
70. Anderson GG, Martin SM, Hultgren SJ. Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. Microbes Infect 2004; 6:1094-101.
71. Justice SS, Hung C, Theriot JA, Fletcher DA, Anderson GG, Footer MJ, Hultgren SJ. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:1333-8.
72. Schembri MA, Klemm P. Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel fimbriated variants and ramification for virulence. Infect Immun 2001; 69:1322-8.
73. Torzewska A, Staczek P, Rozalski A. Crystallization of urine mineral components may depend on the chemical nature of *Proteus* endotoxin polysaccharides. J Med Microbiol 2003; 52:471-7.
74. Li X, Zhao H, Lockatell CV, Drachenberg CB, Johnson DE, Mobley HL. Visualisation of *Proteus mirabilis* within the matrix of urease-induced bladder stones during experimental urinary tract infection. Infect Immun 2002;70:389-94.
75. Nickel JC, McLean RJC. Bacterial biofilms in urology. Infect Urol 1998; 11:169-75.
76. Nickel JC, Emtage J, Costerton JW. Ultrastructural microbial ecology of infection-induced urinary stones. J Urol 1985; 133:622-7.
77. Nickel JC, Olson M, McLean RJ, Grant SK, Costerton JW. An ecological study of infected urinary stone genesis in an animal model. Br J Urol 1987; 59:21-30.
78. Cohen TD, Preminger GM. Struvite calculi. Semin Nephrol 1996; 16:425-34.
79. Ahuja SK. Chronic bacterial prostatitis. 2006. <http://www.emedicine.medscape.com/article/458391-overview> (02.05.2009)
80. Nickel JC. Chronic prostatitis: an infectious disease? Infect Urol 2000; 13:31-8.

81. Ahuja SK. Nonbacterial prostatitis. 2006. <http://www.emedicine.medscape.com/article/456165-overview> (Last accessed 2 May 2009.)
82. Domingue GJ Sr, Hellstrom WJ. Prostatitis. Clin Microbiol Rev 1998; 11:604-13.
83. Krieger JN, Riley DE, Roberts MC, Berger RE. Prokaryotic DNA sequences in patients with chronic idiopathic prostatitis. J Clin Microbiol 1996; 34:3120-8.
84. Nickel JC, Costerton JW. Bacterial localization in antibiotic-refractory chronic bacterial prostatitis. Prostate 1993; 23:107-14.
85. Tanner MA, Shoskes D, Shahed A, Pace NR. Prevalence of corynebacterial 16S rRNA sequences in patients with bacterial and "nonbacterial" prostatitis. J Clin Microbiol 1999; 37:1863-70.
86. Hochreiter WW, Duncan JL, Schaeffer AJ. Evaluation of the bacterial flora of the prostate using a 16S rRNA gene based polymerase chain reaction. J Urol 2000; 163:127-30.
87. Nickel JC, Downey J, Clark J, Ceri H, Olson M. Antibiotic pharmacokinetics in the inflamed prostate. J Urol 1995; 153:527-9.
88. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. Clin Microbiol Rev 2001; 14:244-69.
89. Vraneš J. Etiopatogeneza i dijagnostika infekcije dekubitalnih vrijedova. U: Hančević J, i sur. Dekubitus, etiologija, profilaksa i liječenje. Zagreb: Medicinska naklada, 2003: 89-105.
90. Serralta VW, Harrison-Balestra C, Cazzaniga AL, Davis SC, Mertz PM. Lifestyles of bacteria in wounds: presence of biofilms? Wounds 2001; 13:29-34.
91. Percival S, Bowler P. Understanding the effects of bacterial communities and biofilms on wound healing. 2004. <http://www.worldwidewounds.com/2004/july/Percival/Community-Interactions-Wounds.html> (Last accessed 2 May 2009)
92. Harrison-Balestra C, Cazzaniga AL, Davis SC, Mertz PM. A wound-isolated *Pseudomonas aeruginosa* grows a biofilm in vitro within 10 hours and is visualized by light microscopy. Dermatol Surg 2003; 29:631-5.
93. Mertz PM. Cuteaneous biofilms: friend or foe? Wounds 2003; 15:129-32.
94. Center for Biofilm Engineering. Module 7, Section 4: Biofilms in chronic wounds. http://www.erc.montana.edu/biofilm-book/MODULE_07/Mod07_S04-2_Blue.htm (Last accessed 2. May 2009)
95. Percival SL, Bowler PG. Biofilms and their potential role in wound healing. Wounds 2004; 16:234-40.
96. Moore K. Compromised wound healing: a scientific approach to treatment. Br J Community Nurs 2003; 8:274-8.
97. Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. Nature 2002; 417:552-5.
98. Rogan MP, Geraghty P, Greene CM, O'Neill SJ, Taggart CC, McElvaney NG. Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence. Respir Res 2006; 7: 29.
99. Cegelski L, Marshall GR, Eldridge GR, Hultgren SJ. The biology and future prospects of antiviral therapies. Nat Rev Microbiol 2008; 6:17-27.
100. Johansen C, Falholt P, Gram L. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. Appl Environ Microbiol 1997; 63:3724-8.
101. Chaignon P, Sadovskaya I, Ragunah C, Ramasubbu N, Kaplan JB, Jabbouri S. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. Appl Microbiol Biotechnol 2007; 75:125-32.

Significance of microbial biofilm occurrence in the pathogenesis and treatment of chronic infections

Jasmina Vraneš^{1,2}, Vladimira Leskova²

¹Zagreb University Medical School, ² Institute of Public Health "Dr. Andrija Štampar", Zagreb; Zagreb, Croatia

ABSTRACT

The ability of bacterial cells to adhere to biotic and abiotic surfaces, to function as a group and to mutually communicate is crucial in the development of chronic infectious diseases. Sessile communities of microorganisms today known as biofilm are involved in a number of chronic bacterial infections. Key characteristics of biofilm-infections are the persistence of infection and resistance to antimicrobial agents and host defenses. Advances in the technology and the application of new microscopic and molecular methods while studying ultrastructure and functional relationships inside the biofilm give hope that a new therapeutic way to control biofilm-infections, one of the greatest challenges of 21st century, will be found.

Key words: biofilm, chronic infections, pathogenesis, therapy

Original submission:

06 April 2009;

Revised submission:

08 April 2009;

Accepted:

03 May 2009.