

UTJECAJ BIOFILMA NA CIJELJENJE RANE I POSTUPAK ZA IDENTIFIKACIJU BIOFILMA U RANI

JASENKA ŠKRLIN

Centar za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije, Klinička bolnica Dubrava, Zagreb, Hrvatska

Mikroorganizmi mogu postojati kako u planktonskom, tako i u stanju biofilma. Svaki fenotip ima ulogu u zakašnjelom zacjeljivanju te uzrokuje infekcije akutnih i kroničnih rana. Međutim, virulentni biofilm je osnovni razlog da do zacjeljivanja rana ne dolazi pravodobno. Zbog hipoteze da mikroorganizmi mogu adherirati za svaku površinu, biofilm se može naći u svim kroničnim ranama. Međutim, sam po sebi biofilm nije najveća prepreka zacjeljivanju kroničnih rana, već njegova virulentnost i patogenost. Ustanoviti koji specifični patogeni biofilm uzrokuje zakašnjelo zacjeljivanje rana pomoglo bi boljoj praksi u liječenju i njezi rana, no poteškoća i daljnje provođenje velikih randomiziranih kontroliranih studija o biofilmu moguće je samo vizualnom dijagnostikom odnosno dokazom biofilma mikroskopskom analizom histološki obrađenog biotata rana.

Ključne riječi: bakterije, biofilm, kronična infekcija, dijagnostika

Adresa za dopisivanje: Prof. dr. sc. Jasenka Škrilin, dr. med.
Centar za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije
Klinička bolnica Dubrava
Avenija Gojka Šuška 6
10 000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: jas@kdb.hr

UVOD

Biofilm u ranama, implantatima i trajnim ugrađenim uređajima stvara kronične, a vrlo često i za život opasne infekcije i upale. Takve perzistentne infekcije mogu dovesti do oštećenja tkiva, neuspjeha ugrađivanja implantata, disfunkcije uređaja pa čak i do smrti. Biofilm infekcije je vrlo teško liječiti zbog toga što matrica (engl. *matrix*) biofilma uzročniku (koji su često rezistentne bakterije) osigurava fizičku zaštitu od antibiotske terapije.

Brza detekcija i identifikacija biofilma može dati prijeko potrebne informacije za ranu dijagnozu i učinkovito liječenje. Međutim, identifikacija bakterijskih vrsta u biofilmu je izazov zbog njihove fiziološke heterogenosti. Konvencionalne metode otkrivanja biofilma oslanjaju se na kultivaciju koja za dijagnozu zahtijeva nekoliko dana i ima nisku osjetljivost, dok su molekularne metode detekcije, kao što su lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction* - PCR) i fluorescentna hibridizacija *in situ* (engl. *Fluorescence in situ Hybridization* - FISH) razvijene na temelju

genotipa i genomskog profiliranja te ostaju izazov za brzo prepoznavanje biofilma (1).

BIOFILM I RANA

Primarna funkcija kože je da služi kao barijera prema vanjskoj okolini. Zacjeljivanje rana na koži je složeni proces koji uključuje staničnu proliferaciju, migraciju i preoblikovanje tkiva što ponovno dovodi do uspostave njezine primarne funkcije. Propust u liječenju rana može dovesti do daljnjih komplikacija, uključujući septikemiju, kroničnu bol, prolongiranu hospitalizaciju, amputaciju i smrt. U humanoj medicini, kronične rane uključuju rane donjih ekstremiteta zbog komorbiditeta kao što je šećerna bolest, visoki tlak ili venska hipertenzija i sl. Bakterije prisutne u kroničnim ranama imaju ulogu u odgođenom zacjeljivanju tkiva. Smatra se da bakterije prisutne u kroničnim ranama ne postoje samo u planktonskom obliku, već su one karakterizirane i kao polimikrobne kolonije bakterija u zajednici, zvanom biofilm (2).

Biofilm se sastoji od skupina bakterija koje su adheirane na površinu okružene ekstracelularnim polimernom matricom. Matrica biofilma čini više od 90 % suhe mase biofilma stvarajući trodimenzionalnu mikrookolinu koja štiti bakterije. Takva arhitektura je jedinstvena značajka koja definira biofilm, regulirajući njegovu fizičku i funkcionalna svojstva. U matrici, ovisno o bakterijskoj vrsti razlikujemo fizičku strukturu biofilma i sastav ekstracelularne polimerne supstancije (engl. *Extracellular Polymeric Substances* - EPS) kao što su polisaharidi, proteini, nukleinske kiseline i lipidi. Na primjer, polisaharidi su neutralni u streptokokima (3), polianionski u pseudomonasu (4) i polikationski u stafilokoku (5). Unutar vrste EPS su još raznolikiji: polisaharidi iz različitih sojeva *Streptococcus thermophilus* imaju različite sastave i omjere monomera te posjeduju različite molekulske mase. Funkcija biofilma je raznolika i uključuje zaštitu od okoline, skladištenje hrane i staničnu komunikaciju (engl. *quorum sensing*). Prema tome, ekspresija gena i fenotip bakterija u biofilmu je različita od slobodno-živućih planktonskih bakterija.

Prisutnost biofilma u kroničnim ranama dovodi do nekoliko zajedničkih obilježja; onemogućuju djelovanje antibiotika na bakterije te održavaju zahvaćeno inficirano tkivo u perzistentnom upalnom stanju. Dodatno, dokazano je da prisutnost biofilma inducira kroničnu i/ili "tihu" upalu te odgađa zacjeljivanje rana, ali su mehanizmi zakašnjelog zacjeljivanja nedovoljno poznati (6).

U nedavno objavljenom članku Marano i sur. (2) su dokazali da sastav sekreta iz biofilma bakterija može inhibirati normalno zacjeljivanje rane uključujući staničnu proliferaciju i migraciju. Za eksperiment su uključili dvije najčešće bakterije povezane s kroničnim ranama *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Toplinskom obradom i mikrofiltracijom dokazano je da je biofilm aktivnost *S. aureus* zbog proteina, za razliku od *P. aeruginosa* čija je aktivnost posljedica djelovanja malih molekula. Proteomskom analizom identificirano je nekoliko proteina koji su navodno povezani s usporenim zacjeljivanjem rana, uključujući: alfa hemolizin, alkohol dehidrogenazu, fruktoza-bifosfat aldolazu, laktat dehidrogenazu i epidermalni stanični razlikovni inhibitor (engl. *epidermal cell differentiation inhibitor*).

INFEKCIJE POVEZANE SA STRANIM TIJELOM

Formiranje biofilma je presudni korak u patogenezi mnogih subakutnih i kroničnih bakterijskih infekcija, uključujući i infekcije povezanih sa stranim tijelom. Unatoč sterilizaciji i aseptičkim postupcima u SAD-u

2004. g. učestalost infekcija povezanih s implantatima kao rezultatom bakterijske adhezije i formacije biofilma na implantacijskom mjestu čini preko polovice svih bolničkih infekcija s procjenom od 1 milijun slučajeva na godinu.

Prema *National Institutes of Health* biofilm produkcija smatra se medicinski važnim pojmom, jer sudjeluje u preko 80 % mikrobnih infekcija u ljudskom tijelu (7). U prirodi biofilm stvara 99 % bakterija, a kao najčešći mikroorganizmi odgovorni za dvije trećine infekcija povezanih sa stranim tijelom su bakterije koje formiraju - stafilokoki (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. lungdunensis*), nakon kojih slijede *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterococcus* spp, a od gljivičnih infekcija *Candida* sp.

DIJAGNOSTIKA

Bakterije koje su na dnu biofilma (pod anaerobnim uvjetima) ujedno su i razlogom ekstremne rezistentne antibiotske terapije kao i često izrazito teške kultivacije biofilm producirajućih bakterija tradicionalnim mikrobiološkim metodama (8).

Da bi se direktno vizualizirala trodimenzionalna struktura bakterijskog biofilma *Center for Genomic Sciences* razvio je novi dijagnostički protokol - konfokalnu lasersku skener mikroskopiju (*Confocal Laser Scanning Microscopy* - CLSM) temeljenu na 16S rRNA uz metodu fluorescentne hibridizacije *in situ* (*Fluorescence In situ Hybridization* - FISH).

Na temelju strukturnih i kemijskih razlika između biofilma autori članka (1) opisuju novu metodu, koja se na temelju principa "kemijskog nosa" može koristiti za detekciju i razlikovanje vrsta pa čak i sojeva unutar biofilma. Riječ je o metodi zlatne nanočestice temeljene na višekanalnom fluorescentnom senzoru (engl. *gold nanoparticle /AuNP/ - based multichannel fluorescence sensor*) za detekciju i identifikaciju sastava biofilma specifičnog za vrstu na temelju sveukupnih fizikalno-kemijskih svojstava.

DIJABETIČKO STOPALO

Rane dijabetičkog stopala su obično kolonizirane različitim mikrobiološkom florom te mogu biti dodatno inficirane specifičnim uzročnikom. Kako je poznato da su uzročnici unutar biofilma 1000 puta rezistentniji na antimikrobnu terapiju (za razliku od planktonskih bakterija), a mogu biti prisutni u kroničnim ranama, sve veći je interes otkriti njihovu etiološku ulogu. U nedavnom

istraživanju (9) prisutnost uzročnika unutar biofilma u ranama dijabetičkog stopala dokazalo se upotrebom nekoliko metoda vizualizacije. Uzorci nakon *debridement* rana dijabetičkih bolesnika, histološki obrađeni (rezovi) pregledani su pomoću svjetlosnog mikroskopa (preparat po Gramu), fluorescentne metode (engl. *Fluorescence In Situ Hybridisation* - FISH) i elektronskim mikroskopom (engl. *Environmental Scanning Electron Microscope* - ESEM) obuhvaćujući i kvantifikaciju broja kolonija (engl. *Colony Forming Units* - CFU). Svi su uzorci imali $>10^5$ CFU/g tkiva. Rezultat pilot studije bio je da svjetlosni mikroskop i FISH metoda vizualiziraju/ističu bakterijske kolonije i matricu biofilma učinkovitije nego ESEM, te da se i rutinskim Gram preparatom mogu dokazati mikrokolonije i/ili amorfne tvari (indikativno za biofilm) u kroničnim ranama.

OSTALE KLINIČKE SLIKE

Unutar biofilma mikroorganizmi su zaštićeni od fagocitoze i ostalih antimikrobnih djelovanja te se zbog lokalizacije ne mogu dokazati rutinskim mikrobiološkim metodama. To je ujedno i razlog „sterilnih kultura“, naročito kroničnih rana (*ulcus cruris*, dijabetičko stopalo, ishemijski ulkusi potkoljenica i dr.) kao i infekcija kirurškog mjesta (*Surgical Site Infections* – SSI). U recentnoj literaturi autori (10-12) opisuju studije u kojima su najnovijim metodama FISCH/CLSM dokazali uzročnike takvih vrsta infekcija.

Biofilm od nekoliko bakterijskih vrsta (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp, *Micrococcus* sp. uz dominaciju *Pseudomonas aeruginosa*) opisuju Malic i sur. (10) u nezacijeljivanim inficiranim kroničnim ranama (13). Slično opisuju i Bjarnsholt i sur. (11) u venskim i ishemičnim ulkusima nogu te dijabetičkom stopalu gdje su u bazalnom dijelu biofilma izolirali *Pseudomonas aeruginosa*, koji je bio uzrokom neuspjeha antibiotske terapije i antifagocitnog djelovanja domaćina.

Osim navedenih infekcija, biofilm je mnogo češće uzrokom neeradiceranih infekcija povezanih sa stranim tijelom, tj. implantatima kao što su: centralni venski kateter, srčane valvule, mehaničko srce (VAD), koronarne prenosnice (*bypass*), srčani stimulator (*pacemaker*), neurokirurški ventrikularni *shunt*, ugradbeni neurološki stimulatori, artroproteze, medicinski proizvodi za fiksaciju fraktura, te druge različite vrste implantata - dojke, kohleje, intraokularne leće, zubiju i dr.

Prevenција adhezije biofilma je puno bolje rješenje nego liječenje istoga, jer se time izbjegava potreba za dugotrajnom, vjerojatno neučinkovitom sistemskom antibiotskom terapijom, a i reducira se rizik od razvoja rezistencije uzročnika kao i crijevne flore.

ZAKLJUČAK

Mikroorganizmi rutinski kontaminiraju, koloniziraju i često inficiraju sve tipove rane. Infekcija rane i moguće kritična kolonizacija su glavne prepreke za zacjeljivanje. Unutar zadnjih 10 godina, kod kroničnih rana sve se više prepoznaju prisutnost i negativni učinci biofilma. Zakašnjelo zacjeljivanje rana uglavnom se odnosi na prisutnost mikroorganizama u biofilmu, koji su otporni na obranu domaćina i antimikrobnu terapiju

Pomoću brzog (nekoliko minuta) i učinkovitog višekanalnog nano-senzora može se uspješno detektirati i diferencirati biofilm od patogenih i apatogenih bakterija. Ove odrednice učinkovite su za biofilm na površini i u eksperimentalnom modelu rane, a rezultat dijagnostike može biti vizualan ili snimljen kamerom. Sumarno, takvom se dijagnostikom može omogućiti ciljano liječenje biofilma antimikrobnim oblogama umjesto terapije antibioticima širokog spektra, koji puta i empirijski (1).

L I T E R A T U R A :

1. Li X, Kong H, Mout R i sur. Rapid identification of bacterial biofilms and biofilm wound models using a multichannel nanosensor. ACSNANO 2014; 8: 12014-19.
2. Marano RJ, Wallace HJ, Wijeratne D, Fear MW, Wong HS, O'Handley R. Secreted biofilm factors adversely affect cellular wound healing responses *in vitro*. Sci Rep 2015, 5: 13296.
3. Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. Microbiology 2001; 147: 3-9.
4. Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Curr Opin Microbiol 2007; 10: 644-8.
5. Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. Mol Microbiol 2002; 43: 1367-78.
6. Rhoads DD, Wolcott RD, Percival SL. Biofilms in wounds: management strategies. J Wound Care 2008; 17: 502-8.
7. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 999-1007.
8. Nistico L, Gieseke A, Stoodley P i sur. Fluorescence "in situ" hybridization for the detection of biofilm in the middle ear and upper respiratory tract mucosa. Methods Mol Biol 2009; 493: 191-213.
9. Oates A, Bowling FL, Boulton AJM, Bowler PG, Metcalf DG, McBain AJ. The visualization of biofilms in chronic diabetic foot wounds using routine diagnostic microscopy methods. J Diabetes Res 2014, Article ID 153586, 8 pages.
10. Malic S, Hill KE, Hayes A i sur. Detection and identification of specific bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent *in situ* hybridization (PNA FISH). Microbiology 2009; 155: 2603-11.

11. Bjarnsholt T, Kirketerp Moller K, Jensen PO i sur. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 2-10.

12. Kathju S, Nistico L, Hall-Stoodley L i sur. Chronic surgical site infection due to suture-associated polymicrobial bio-

film. *Surg Infect* 2009; 10: 457-61.

13. Percival SL, McCarty SM, Lipsky B. Biofilms and wounds: An overview of the evidence. *Advances Wound Care* 2015; 4: 373- 81.

SUMMARY

IMPACT OF BIOFILM ON HEALING AND A METHOD FOR IDENTIFYING IT IN THE WOUND

J. ŠKRLIN

Dubrava University Hospital, Department of Clinical Microbiology and Hospital Infections, Zagreb, Croatia

The skin microbiome is the aggregate of microorganisms that reside on the surface and in deep layers of the skin. Skin is colonized by bacteria, fungi, viruses and mites, maintaining a balance. Disruption in the ecosystem results in skin infections. Chronic wounds in diabetics, elderly and immobile individuals are at risk of skin organisms to invade and become pathogenic upon breach of the skin barrier. The bacteria of the skin microbiome may contribute to delayed healing and persistent inflammation. *Staphylococcus epidermidis* is an invasive skin organism that causes infection, i.e. hospital acquired infection (HAI) on medical devices and form biofilm. At the most basic level, biofilm can be described as bacteria embedded in a thick, slimy barrier of sugars and proteins. The biofilm barrier protects the microorganisms from external threats. Biofilms provide a reservoir of potentially infectious microorganisms that are resistant to antimicrobial agents, and their importance in the failure of medical devices and chronic inflammatory condition is increasingly being recognized. Particular research interest exists in the association of biofilms with wound infection and non-healing, i.e. chronic wounds. There is now strong evidence that biofilm is present in the majority of chronic wounds. Specialized microscopic techniques used since 2008 have allowed several research groups to demonstrate that 60% to 90% of chronic wounds have biofilm *versus* only 6% of acute wounds. While many studies confirm that chronic wounds often contain a polymicrobial flora, controversy remains with regard to whether these organisms directly contribute to non-healing. It seems most likely that individual bacteria themselves are not directly responsible for non-healing wounds. Rather, there is direct correlation between the presence of four or more distinct bacterial species in a wound and non-healing, suggesting that mixed microbial populations are the cause of pathology. The most reliable method to confirm the presence of a biofilm is specialized microscopy, e.g., bright-field, fluorescence *in situ* hybridization (FISH), and environmental scanning electron microscope (ESEM). Surface wound cultures underestimate total wound microbiota – misleading. Histological staining of deep debrided tissue shows evidence of biofilms. Now it is recognized that the majority of microbial species in chronic wounds are anaerobic bacteria (deep swabbing techniques yield similar findings to biopsies) if samples are processed within two hours. Traditional (wound culture method) cultures have limitations because all microbes (the organisms within the biofilm) cannot be isolated in culture or cannot be detected. Therefore, the most effective methods are molecular analyses.

Newer methods using microbial DNA may help decipher the role the microbes play in infection and critical colonization and provide quantitative and qualitative information on the range of microorganisms, including bacteria and biofilm formation.

Key words: bacteria, biofilm, chronic infections, diagnosis