Biofilm kao faktor virulencije bakterije Acinetobacter baumannii

Kuzle, Josipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:531814

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO- MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

BIOFILM KAO FAKTOR VIRULENCIJE BAKTERIJE *Acinetobacter baumannii*

BIOFILM AS VIRULANCE FACTOR OF *Acinetobacter baumannii*

SEMINARSKI RAD

Josipa Kuzle
Preddiplomski studij Znanosti o okolišu
(Undergraduate Study of Environmental science)
Mentor: doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

Zagreb, 2017.

Sadržaj

1 Uvod 1
2 Općenito o biofilmu 2
2.1 Biofilm kao faktor virulencije 5
2.1.1 Biofilm kao faktor virulencije kod bakterije *Acinetobacter baumannii* 8
3 Metode kojima se oslabljuje rezistencija biofilma na antibiotike 11
3.1 Metode kojima se oslabljuje rezistencija biofilma *Acinetobacter baumannii* 12
4 Literatura 14
5 Sažetak 16
6 Summary 16

1 Uvod

U posljednjih nekoliko godina biofilm je postao jedna od najaktualnijih tema u mikrobiološkim istraživanjima. Svakim novim istraživanjem nadograđivalo se postojeće znanje o njegovoj strukturi, svojstvima i načinu nastajanja. Time se i sama definicija biofilma neprestano mijenjala. Biofilm je sesilna zajednica mikroorganizama, najčešće bakterija koje su međusobno povezane i uklopljene u izvanstanični matriks koji su same stvorile. Često ih se zbog svoje visoke rezistentnosti i preživljavanju u teškim okolišnim uvjetima, ubraja u glavni faktor virulencije. Ključni mehanizmi za visoku otpornost biofilmova su: ograničena difuzija, enzimi koji uzrokuju neutralizaciju, heterogenost funkcija, spori stupanj rasta, prisutnost otpornih stanica i fenotip biofilma s prilagodljivim mehanizmima. Osim u biofilmu, mikroorganizmi mogu živjeti i slobodnim (planktonskim) načinom života. Razlika u ekspresiji gena između planktonskih stanica i zajednice biofilma uključuje povećanu i/ili smanjenu regulaciju različitih skupina gena. Smanjenje regulacije gena za popravljanje DNA u stanicama biofilma, pokazuje da je učestalost spontanih mutacija, a time i pojava novih genetičkih svojstava povišena unutar biofilma. Biofilm je izrazito rasprostranjen način života u okolišu. Može ga činiti samo jedna bakterijska vrsta, no češće se sastoji od više vrsta bakterija, ili bakterija i gljivica. Neke od najčešćih vrsta koje tvore biofilm su *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginos, Klebsiella pneumoniae,* i *Acinetobacter baumannii*.

Acinetobacter baumannii su gram-negativni kokobacili, nepokretni, obligatni aerobi, nađeni u tlu i vodi. Pripadaju porodici *Moraxellaceae* unutar reda *Pseudomonadales*. Samo je *A. baumanni* u rodu *Acinetobacter* identificiran kao uzročnik bolesti kod ljudi. *A. baumannii* je oportunistički patogen, rezistentan na više lijekova (engl. MultiDrug Resistant - MDR) te posjeduje mnogobrojne mehanizme rezistencije. Uzrokuje široki raspon infekcija s povišenom stopom smrtnosti, od kojih su najpoznatije upala pluća, meningitis, infekcije mokraćnog sustava i dr. Znanstvenici smatraju da antibiotici nisu najbolje rješenje u liječenju infekcija izazvanih ovom bakterijom jer većina antibiotika djeluje na planktonske stanice, a ne na biofilm. Stanice u biofilmu stječu gene za rezistenciju na antibiotike procesom konjugacije. Glavni cilj proučavanja biofilmova jest što učiniti da se ublaži njihovo virulentno djelovanje te kako smanjiti njihovu rezistenciju.

2 Općenito o biofilmu

Danas je poznato da u prirodi postoje dva načina života mikroorganizama: jednostanična životna faza, u kojoj su stanice slobodnoživuće (planktonske) i višestanična životna faza, u kojoj stanice sesilno žive tvoreći biofilm. Tijekom života moguće je izmjenjivati faze. U kojoj fazi će pojedina bakterija živjeti, ovisi isključivo o okolišnim uvjetima u kojima se nalazi.

U ovom izmjeničnom ciklusu, bakterije ostvaruju dva fiziološka prijelaza u diferenciranju ekspresije gena: 1) prijelaz planktonskih stanica u sjedilačke stanice koje prevladavaju u biofilmu i 2) prijelaz sesilnih u nove slobodnoživuće stanice. Razlika u ekspresiji gena između planktonskih stanica i zajednice biofilma uključuje povećanu i/ili smanjenu regulaciju različitih skupina gena. Primjerice, geni koji sudjeluju u željezo-sumpor metabolizmu, metabolizmu lipida, transportu aminokiselina i ugljikohidrata, biosintezi sekundarnih metabolita te otpornosti na stres podređeni su tijekom formiranja biofilma. U metabolizmu željeza, koncentracija željeza u mediju je vrlo bitan signal okoliša koji potiče ekspresiju adhezijskih čimbenika, koji su ključni za fazu razvoja biofilma. Usporedno s planktonskim stanicama, u biofilmu su jače eksprimirani geni za sintezu željeza. Smanjenje regulacije gena za popravljanje DNA u stanicama biofilma, pokazuje da je učestalost spontanih mutacija, a time i pojava novih genetičkih svojstava povišena unutar biofilma (Berlanga i Guerrero 2016).

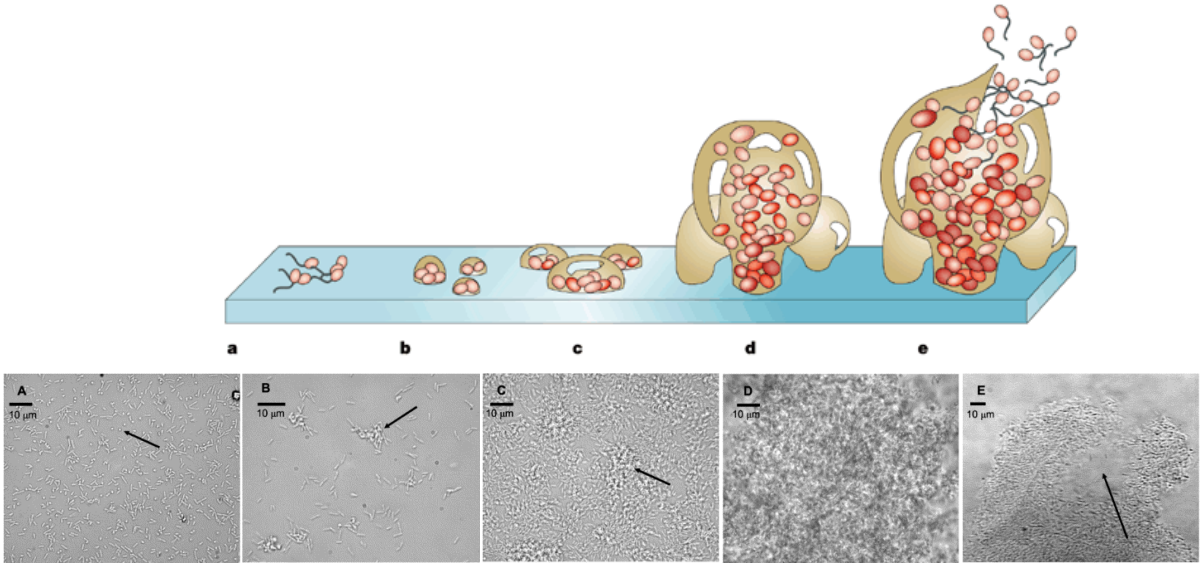
U protekla dva desetljeća definicija biofilma neprestano se mijenjala jer svako novo istraživanje nadograđuje postojeće znanje o stvaranju, strukturi, sazrijevanju i rezistenciji. Biofilm je sesilna zajednica mikroorganizama. Stanice u biofilmu su reverzibilno povezane sa supstratom i međusobno te uklopljene u izvanstanični matriks polisaharidnih polimera (Tab. 1.) koji su same stvorile. Biofilm se povezuje s brojnim bakterijskim infekcijama osobito u

Tablica 1. Kemijski sastav biofilma (Jamal i sur. 2015)

Sastav	**Udio (%)**
Stanice mikroba	2-5
DNA i RNA	<1-2
Polisaharidi	1-2
Proteini (i enzimi)	<1-2
Voda	do 97

bolnicama (npr. 65% svih infekcija uzrokovanih mikrobima i 80% svih kroničnih infekcija u Pakistanu) (Jamal i sur. 2015). Ključna karakteristika infekcija biofilmom jest rezistencija na antimikrobne lijekove i obranu imunološkog sustava domaćina.

Formiranje biofilma (Sl. 1.) odvija se u nekoliko faza. Prije prve faze formiranja, dolazi do kondicioniranja neke površine polimerima iz vodenog okoliša, što omogućuje adherenciju mikroorganizama. Površine na kojima se može naći biofilm jesu metal, plastika, kamen, čestice zemlje, medicinski implantati te tkiva (Vraneš i Leskovar 2009).

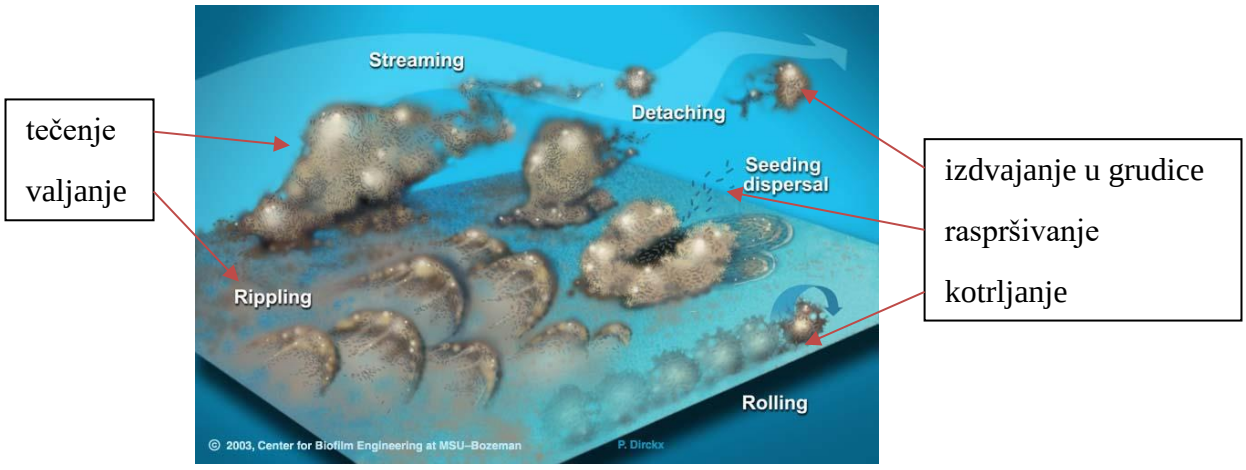


Slika 1. Stvaranje biofilma: a) Reverzibilno vezivanje; b) Ireverzibilno vezivanje (početni skupovi sesilnih stanica); c) Sazrijevanje-1 nakupina ugrađenih u matriks; d) Sazrijevanje-2 nakupine dosežu maksimalnu debljinu oko 100 µm; e) Oslobađanje (raspršivanjem) u okoliš novih slobodnoživućih stanica uz stvaranje praznina unutar nakupina (Abram 2016, Sauer i sur. 2002).

U prvoj fazi dolazi do transporta i reverzibilnog vezivanja bakterija za površinu, na kojoj se nalaze organski i anorganski nutrijenti. Površina biofilma je vrlo aktivna. Na njoj dolazi do istovremenog pričvršćivanja i otpuštanja bakterija. Bakterije se iz biofilma spontano odvajaju, dok se istovremeno planktonske bakterije za nju pričvršćuju. Nakon toga slijedi stvaranje stabilne veze između pojedinačnih stanica te lučenje izvanstanične polimerne supstance koji formira mostove, što rezultira ireverzibilnim vezanjem planktonskih stanica za površinu supstrata. Posljednja faza jest nakupljanje bakterijskih stanica u višeslojne gljivolike nakupine i kolonizacija same površine. Bakterije pričvršćene za podlogu, rastu i dijele se formirajući mikrokolonije, koje se smatraju osnovnim organizacijskim jedinicama biofilmova. Održavanje takve višestanične zajednice bilo bi teško bez postojanja međustanične

komunikacije bakterijskih stanica, posredovane malim molekulama sa sposobnošću difuzije u izvanstanični okoliš, kako bi bakterijama u blizini priopćile da se pripreme na neugodne promjene u okolini (Vraneš i Leskovar 2009). Dokazano je da predmetni kemijski signali, mogu biti prepoznati ne samo od strane bakterijskih stanica iste vrste, već i od ostalih mikrobskih vrsta pa čak i od nekih složenijih organizama.

Biofilm je izrazito rasprostranjen način života u okolišu. Biofilm može činiti samo jedna bakterijska vrsta, no češće se sastoji od više vrsta bakterija, ili bakterija i gljivica. Jednom pričvršćeni za površinu, mikroorganizmi biofilma mogu, svojim aktivnostima, doprinositi ili štetiti zbivanjima u okolišu, ovisno o uvjetima koji u njemu vladaju. Unutar biofilma, pojedine vrste su se dobro prilagodile životu u zajednici. Svi nutrijenti koji kruže zajednicom dobro su iskorišteni. Što jedne vrste izluče, druge iskoriste za rast i obrnuto. Biofilmovi mogu nastati na živim ili neživim površinama i mogu prevladati u prirodnim, industrijskim i bolničkim okruženjima. Oni štite mikroorganizme od isušivanja. Najčešće nastaju na granici između dva agregacijska stanja (gotovo na svakoj granici vode i zraka, te zemlje i vode) (Vraneš i Leskovar 2009, Donlan 2002). Glavni sastojak biofilma jest voda i ona je odgovorna za protjecanje nutrijenata unutar samog biofilma (Tab. 1.). U nekim zajednicama je ima čak i do 97% ukupne mase (Jamal i sur. 2015). Ostale izvanstanične supstance koje se nalaze u biofilmu su proteini, DNA i RNA molekule te polisaharidi. Bakterije biofilma mogu se gibati na različite načine čime je omogućena laka zaraza novih tkiva. Biofilm se može gibati kolektivno tečenjem, valjanjem ili kotrljanjem po površini ili izdvajanjem u grudice. Bakterije se mogu raspršiti po okolini pojedinačno ili u skupinama (Sl. 2). Nakupljanjem sedimenata (prašine i ostalih čestica) fluidnost biofilma se smanjuje.



Slika 2. Migracija biofilma (CBE 2003)

Ova višestanična zajednica ima složenu strukturu te pokazuje izmijenjene osobine (fenotip) pojedinih jedinki u skupini uslijed promijenjene brzine razmnožavanja i transkripcije gena koje se ne uočavaju u planktonskih organizama Također, višestruko se povećava otpornost mikroorganizama na dezinficijense u takvim zajednicama. Biofilmovi predstavljaju veliki izazov za znanstvenike, zbog njihovog visokog stupnja rezistentnosti prema antibioticima, što ih čini izuzetno zahtjevnima za tretiranje. Tako, primjerice oprane i vizualno čiste površine mogu još sadržavati biofilm u kojem su mikroorganizmi. Dovoljno je da nakon pranja zaostane 1% mase biofilma da se on ponovno formira (http://miloc.hr/rectorkovi-savjeti-klima/vijest/to-su-biofilmovi-i-kako-nastaju/).

Mnoge specifične osobine biofilma su od biotehnološkog značaja, kao što je sinteza vrijednih spojeva, primjerice etanol i sufraktanti (sufraktant je površinski aktivna tvar koja smanjuje površinsku napetost vode), te poboljšanje ili obrade određenih namirnica, npr. maslina. Biofilm je univerzalno bakterijsko svojstvo s nekoliko glavnih osobina. Njegov razvoj može se podijeliti u tri stadija: povezivanje, sazrijevanje i oslobađanje. U odnosu sa svojstvima na površini, površinski faktori koji određuju početno bakterijsko povezivanje su naboj površine, hidrofobnost i hrapavost (Berlanga i Guerrero 2016).

Biofilmovi ne rastu u beskonačno velike oblike, nego dolazi do stvaranja novih biofilmova, na udaljenim mjestima. Bakterije se otpuštaju iz biofilmova procesima desorpcije, odnosno odljepljivanja s površine, odstranjivanja i disperzije. Desorpcija je izravni prijenos bakterija s površine biofilma u okolni medij. Obično se javlja u ranoj fazi razvoja biofilma. U disperziji, regulatorni sustavi omogućuju fiziološke promjene koje olakšavaju oslobađanje stanica iz biofilma u medij. Desorpcija i odstranjivanje su pasivni oblici "bijega", a disperzija je aktivan proces (Berlanga i Guerrero 2016).

2.1 Biofilm kao faktor virulencije

Patogenost (*grč. pathos* = patnja, bolest) je sposobnost mikroorganizama da uzrokuju bolest. Neki mikroorganizmi uvijek izazivaju bolest kada čovjek (ili neki drugi sisavac) dođe u kontakt s njima (obligatno patogeni), dok drugi to čine ponekad (oportunistički patogeni). Oportunistički patogeni vrlo rijetko uzrokuju bolesti kod osoba koje su imune na bolesti koje te bakterije uzrokuju (Kalenić i sur., 2013). Patogenost je sposobnost izazivanja bolesti, a virulencija (*lat. virus* = otrov) stupanj patogenosti i određena je čimbenicima virulencije, odnosno svojstvima mikroorganizama koji doprinose virulenciji. Visoka patogenost obilježena je visokom virulentnošću, i obrnuto. Postoje mjere kojima se virulentnost može izraziti kvantitativno, kao broj mikroorganizama potrebnih da bi izazvali bolest. Infektivna doza (ID_{50})

je broj mikroorganizama neophodan da izazove infekciju u 50% eksperimentalnih životinja. Primjerice, za zarazu kolerom bakterijama *Vibrio cholerae* potrebno je 10^8 bakterija (Abram 2016). Letalna doza (LD_{50}) je broj mikroorganizama neophodan da izazove smrt u 50% eksperimentalnih životinja. Za *Clostridium botulinum* koji uzrokuje botulizam, dovoljna je doza od 1- 3 nanograma toksina po jednom kilogramu tjelesne mase sisavca, da bi bila letalna (Horowitz 2005). Mikroorganizam je virulentniji što ima niži LD_{50} ili ID_{50} (Kalenić i sur., 2013). Hoće li doći do infekcije ili ne, ne ovisi samo o mikroorganizmu koji je uzročnik infekcije, već i o svojstvima domaćina (pacijenta).

Najbitniji čimbenici virulencije su: sposobnost adherencije, bakterijski biofilm, prisutnost kapsule, rezistencija na baktericidnu aktivnost seruma, bakterijska pokretnost i invazivnost u stanicu ili u tkivo, antifagocitni čimbenici te produkcija enzima i toksina (endotoksini i egzotoksini). Stupanj patogena da izazove infekciju ili bolest uvjetovan je patogenim potencijalom, stupnjem infektivnosti i stupnjem invazivnosti. Virulencija se može povećavati (egzaltacija) ili smanjivati (atenuacija). Bakterije luče toksine i/ili onemogućavaju ili umanjuju imuni odgovor organizma (Abram 2016).

Bakterijski biofilm jedan je od glavnih čimbenika u sporijem zacjeljivanju rana te visoka razina proizvodnje biofilma više puta je opisana u organizmima rezistentnim na više lijekova (engl. MultiDrug Resistant Organism - MDRO) (Di Domenico i sur. 2017, Subhadra i sur. 2016). Ipak, bitno je odrediti kvantitativnu korelaciju između same proizvodnje biofilma i profila antimikrobne rezistencije na lijekove. Mnoga istraživanja su pokazala da je čak 60.8% Gram-negativnih bakterija zastupljeno u MDRO-u, od toga 80% vrsta rade biofilm (Di Domenico i sur. 2017). Najveći proizvođači biofilmova (Tab. 2.) su *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* (80%) te nešto manje *Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli* i *Acinetobacter baumannii* (17%), i ostale bakterije svega 3% (Di Domenico i sur. 2017, Jamal i sur. 2015).

U polimikrobnoj kolonizaciji postoje sojevi bakterija koji nemaju sposobnost pravljenja biofilma, no zanimljiva je činjenica da su ti sojevi gotovo uvijek međusobno povezani sa sojevima koje ga mogu raditi. Studije su pokazale da su proizvođači biofilma prisutni u svim kroničnim ranama na koži, što upućuje na to da biofilm predstavlja ključnu determinantu virulencije (Di Domenico i sur. 2017). Nekim sojevima je potrebna posebna vrsta interakcije s drugim vrstama organizama, kako bi opstale u biofilmu. Primjerice, *Legionella pneumophila* ne može rasti u biofilmu ako nije prisutan neki slobodnoživući *Protozoa*. *Salmonella typhimurium* je pronađena u vodenom sustavu koji je sadržavao neodređene

heterotrofne bakterije, što upućuje na to da normalna flora biofilma tog vodenog sustava osigurava uvjete koji podržavaju rast neodređenog organizma (Donlan 2002).

Tablica 2. Popis uobičajenih bakterijskih vrsta i njihov postotak učestalosti tvorenja biofilma (Di Domenico i sur. 2017, Jamal i sur. 2015)

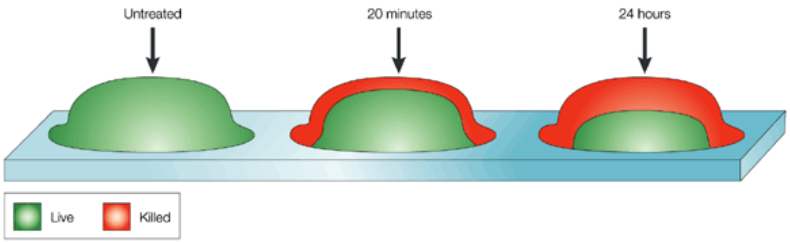
Vrsta	%
Staphylococcus aureus	80
Pseudomonas aeruginosa	
Klebsiella pneumoniae	17
Escherichia coli	
Acinetobacter baumannii	
Staphylococcus epidermidis	3
Enterobacter cloacae	
Actenomyces israelli	
Haemophilus influenza	
Burkholderia cepacia	

Mehanizmi djelovanja antibiotika i biocidne otpornosti biofilmova (biocid je određena vrsta kemikalije ili mikroorganizma koja pomoću kemijskih ili bioloških sredstava vrši kontrolni utjecaj na neki štetni organizam, te ga čini bezopasnim) podijeljeni su u četiri klase:

a) izravna inaktivacija aktivne molekule antibiotika enzimima,
b) adaptacija tj. smanjenje metaboličke aktivnosti, što uključuje i postojanje nedjeljivih stanica te usporavanje njihovog rasta pa tako i širenje antibiotika,
c) matriks biofilma djeluje kao apsorbent ili reaktant pa na taj način smanjuje koncentracije lijeka prije dostizanja ciljnog mjesta i
d) sustavi istjecanja (molekularna pumpa u staničnoj membrani bakterije) poput promjene osjetljivosti membrane biofilma u točki sučelja s antibiotikom čime se smanjuje njegova penetracija i ograničava difuzija (Jamal i sur. 2015).

Razina rezistencije biofilma između zajednica te ključni čimbenici odgovorni za rezistenciju međusobno se mogu razlikovati. Konvencionalnim mehanizmima nije moguće objasniti visoki stupanj rezistencije na antibakterijska sredstva u biofilmu, iako se ti dokazi ne

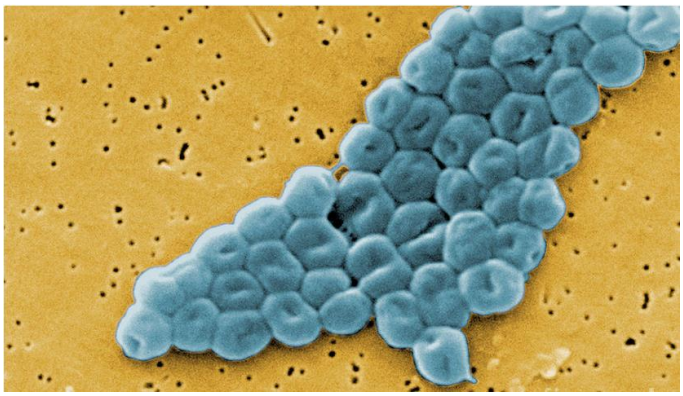
smiju zanemariti u proučavanju otpornosti prilikom rasta pojedinih stanica. Stoga se došlo do zaključka da bakterije unutar biofilma imaju neke unutarnje mehanizme kojima one stvaraju rezistenciju na antibiotike. Do danas je istraženo nekoliko mehanizama koji se smatraju ključnim mehanizmima za visoku otpornost biofilmova. To su: ograničena difuzija, enzimi koji uzrokuju neutralizaciju, heterogenost funkcija, spori stupanj rasta, prisutnost otpornih stanica i fenotip biofilma s prilagodljivim mehanizmima, primjerice izlazna pumpa (Jamal i sur. 2015). Tretiranje biofilma antibioticima često rezultira nepotpunim uništenjem (Sl. 3.) pa nezahvaćene bakterije postaju centar širenja infekcije nakon prestanka antibiotske terapije.



Slika 3. Djelovanje antibiotika na biofilm (Bjarnsholt i sur. 2013)

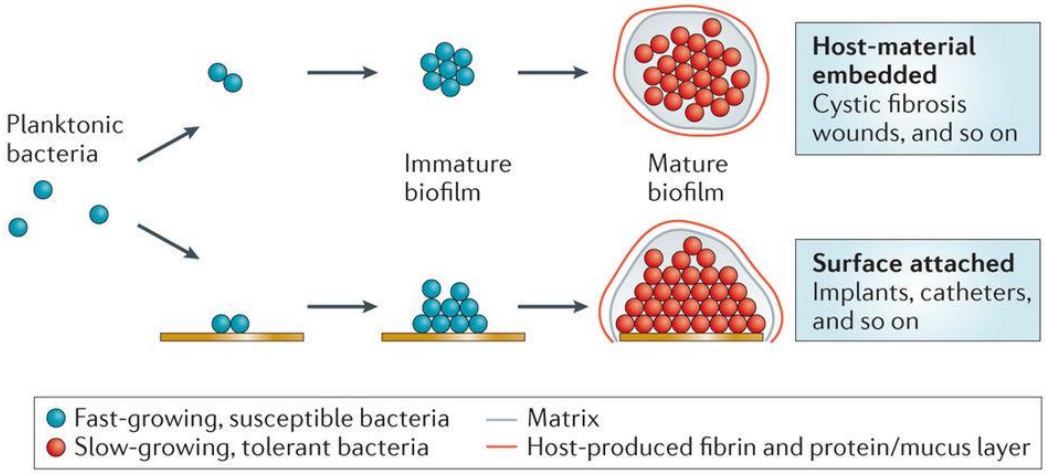
2.1.1 Biofilm kao faktor virulencije kod bakterije *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii (Sl. 4.) su Gram-negativni kokobacili, nepokretni, obligatni aerobi koji ne razgrađuju saharide, nađeni u tlu i vodi. Optimalna temperatura za njihov rast je od 33˚C do 35°C, dok se rast na temperaturi višoj od 44°C koristi za identifikaciju vrste *A. baumannii* (Đekić Malbaša 2017). Pripadaju porodici *Moraxellaceae* (8 rodova, npr. *Acinetobacter Moraxella*, *Psychrobacter* i dr.) unutar reda *Pseudomonadales* (Subhadra i sur. 2016). Do danas je opisano 27 vrsta u rodu *Acinetobacter* od kojih je samo *A. baumanni* identificiran kao uzročnik bolesti i infekcija kod ljudi (Ali i sur. 2017). *A. baumannii* je oportunistički patogen, rezistentan na više lijekova (MDR). Osim toga, posjeduje mnogobrojne mehanizme rezistencije, izazivajući tako infekcije kod teško bolesnih i oslabljenih pacijenata.



Slika 4. Mikroskopski prikaz bakterija *A. baumannii* (Science Source Images 2013)

Uzrokuje široki raspon infekcija s povišenom stopom smrtnosti, od kojih su najpoznatije upala pluća, bakteremija, endokarditis, meningitis, infekcije mokraćnog sustava, infekcije opekotina i rana nastalih kirurškim putem (Ali i sur. 2017, Subhadra i sur. 2016). Sveprisutnost i sklonost postojanju na ljudskoj koži i suhim neživim objektima, kroz duži vremenski period te sposobnost razvijanja faktora rezistencije pomoću svestranog genetičkog stroja, čini *A. baumannii* jednog od najčešćih i najuspješnijih patogena u suvremenom zdravstvenom sustavu širom svijeta. Osim na koži, nađena je i u respiratornom sekretu te sekretu iz dušnika kod oboljelih individua (Howard i sur. 2012). Jedni od najbitnijih faktora virulencije kod *A. baumannii* jesu: aktivnost fosfolipaze C, otpornost na serum, hemolitička aktivnost i proizvodnja acinetobaktina, uz dodatak potpune rezistencije koja pomaže organizmu da preživi unutar domaćina i uzrokuje infekcije (Ali i sur. 2017). Ima izuzetnu sposobnost održavanja u bolničkim sredinama što je jedan od glavnih uzroka njegove virulencije te formiranje biofilma (Tab.2.), koji oblikuje bakterijska zajednica kao odgovor na nepovoljne uvjete u okolini. *A. Baumannii* formira biofilm na biotičkim (npr. rane, mokraćni sustav…) i abiotičkim površinama (npr. staklo, metal…) (Sl. 5.). Biofilm je sustav koji se može prilagoditi unutarnjim uvjetima okoliša domaćina.



Slika 5. Formiranje biofilma na biotičkim i abiotičkim površinama (Bjarnsholt i sur. 2013)

Provedene su studije među 75 zemalja na 5 kontinenata, koje su pokazale da je *A. baumanni* peta po učestalosti infekcija (Goić Barišić 2012, Roca i sur. 2012). Posebno je zabilježena u pustinjama u Iraku pa je ponekad zovu i „Irakibakter“ (Howard i sur. 2012). Velika učestalost bakteremije zabilježena je među pripadnicima američke vojske nakon rata u Iraku. Iako su do danas poznati brojni mehanizmi rezistencije ove vrste, vrlo je teško kontrolirati njegovo širenje unutar bolničke sredine. Svojstva virulencije i patogenost bakterija *A. baumannii* nisu još tako dobro proučena i razjašnjena kao njihov profil rezistencije antibiotika. Pokazano je da stanice u biofilmu stječu gene za rezistenciju na antibiotike procesom konjugacije (Đekić Malbaša 2017).

Jedno od provedenih istraživanja rezistencije *A. baumanni* na antibiotike (Joshi i sur. 2003), koristilo je 29 različitih antimikrobnih sredstava na 180 uzoraka. Dobiveni rezultati pokazali su da je više od 75% uzoraka bilo rezistentno na više lijekova (MDR), a u 70% uzoraka bili su proizvođači β-laktamaze, enzima koji omogućava MDR na β-laktam antibiotike (derivati penicilina). Antibiotici amikacin, ampicilin i imipenem još uvijek su djelotvorna antimikrobna sredstva, no zabilježen je stalni porast vrijednosti inhibitorske koncentracije u 50% izolata. Zabilježena je rezistencija u 60% uzoraka na aztreonam, 60% na enrofloksacin, 29% na imipenem, 73% na moksalaktam i 25% na sparfloksacin (Joshi i sur. 2003). Studija je pokazala da niti jedan od navedenih antibiotika nije pogodan za liječenje infekcija uzrokovanih *A. baumanni*.

U nedavno provedenim istraživanjima koja su koristila molekularne metode identifikacije, potvrđeno je prisustvo *A. baumannii* i izvan bolnica. Izolirana je iz briseva uzetih s konzola za video igrica u igraonicama, iz različitih vrsta zemljišta (poljoprivredno, svinjski

mulj, zemljište kontaminirano naftom…) u različitim dijelovima svijeta (Indija, Francuska, Afrika, Hong- Kong, Velika Britanija i mnoge druge). Može se naći i u termički neobrađenom povrću, u svježim i zamrznutim proizvodima ribe i mesa te u mlijeku i siru (Đekić Malbaša 2017).

Pripadnici roda *Acinetobacter* imaju sposobnost dugog preživljavanja, kako u suhim, tako i na vlažnim površinama. Na suhim površinama u bolničkoj sredini i različitim vrstama medicinske opreme opstaje i do pet mjeseci (Đekić Malbaša 2017). Istraživanja potvrđuju da je bolnica značajan izvor te bakterije, a relativno dugo preživljavanje u bolničkoj sredini doprinosi transmisiji ovog mikroorganizma u toku epidemije.

3 Metode kojima se oslabljuje rezistencija biofilma na antibiotike

Kronična rana ne cijeli u očekivanom razdoblju jer je zaostala u upalnoj fazi cijeljenja i ne može napredovati u daljnjem fiziološkom procesu. Razlog tome je prisustvo velikog broja mikroorganizama, ponajviše bakterija. U takvoj okolini bakterije koloniziraju ranu uz izgradnju biofilma. Biofilm je glavni rezervoar mikroba koje uzrokuju infekciju. Pri tom procesu, glavni elementi nužni za fiziološko cijeljenje i rast posve su razoreni ili inertni (Kučišec-Tepeš 2016).

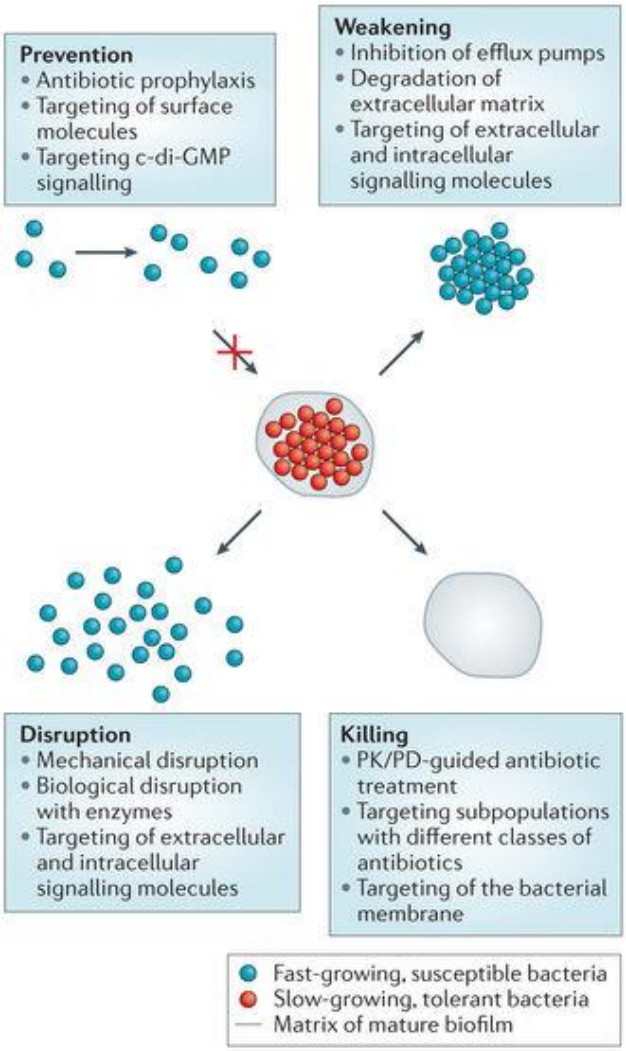
Biofilmovi povezani s ljudskim tijelom uglavnom se teško dijagnosticiraju i liječe, jer imaju povećanu otpornost na antibiotike, antiseptike i imuni odgovor domaćina. Glavni cilj proučavanja biofilmova jest što učiniti da se ublaži njihovo virulentno djelovanje te kako smanjiti njihovu rezistenciju. Činjenica da ni jedan pojedinačni terapijski postupak, kao ni pojedinačni antiseptik nemaju cjelovitu učinkovitost na biofilm, temeljni je razlog da se terapijski postupci i antibiofilm aktivne tvari moraju kombinirati. Suvremena istraživanja ukazala su da primjena antiseptika na kronične rane, ima učinak u prevenciji infekcije. Samo su neki od antiseptika primjenjivi za kronične rane i učinkoviti na biofilm. To su, primjerice oktenidin dihidroklorid, poliheksanidi, povidon jodin i kadeksomer, nanokristalno srebro i manuka-tip meda (Kučišec-Tepeš 2016).

Četiri glavne strategije (Sl. 6.) za tretiranje biofilma su:

a) Prevencija uključuje antibiotičku profilaksu, napadanje površinskih molekula i napadanje cikličnog digvanozin 5'-monofosfata.
b) Oslabljivanje uključuje zaustavljanje molekularne pumpe, razgradnju izvanstaničnog matriksa i napadanje izvanstaničnih i unutarstaničnih signalnih molekula.

c) Razbijanje uključuje mehaničko uklanjanje biofilma, biološka razgradnja enzimima i napadanje izvanstaničnih i unutarstaničnih signalnih molekula.

d) Uništavanje uključuje tretiranje farmakokinetičkim i farmakodinamičkim antibioticima, napadanje potomaka različitim tipovima antibiotika, napadanje bakterijske ovojnice.



Slika 6. Glavne strategije za tretiranje biofilma (Bjarnsholt i sur. 2013)

Najučinkovitija je kombinacija predmetnih strategija. Daljnja istraživanja u razvoju kombiniranih strategija trebala bi biti provedena s pažnjom kako će to utjecati na ljude i hoće li im to ugroziti zdravlje.

3.1 Metode kojima se oslabljuje rezistencija biofilma *Acinetobacter baumannii*

Poznavajući specifičnosti *A. baumannii*, postavlja se pitanje čime tretirati tako otpornu i snažnu vrstu da se oslabi ili potpuno nestane njena patogenost, te postoje li kakvi

mehanizmi kojima bi se ljudi mogli zaštititi od infekcija koje ova bakterija uzrokuje. Novi i učinkoviti tretmani prijeko su potrebni za liječenje tih infekcija. Posljednjih nekoliko godina znatno je smanjen tempo razvoja novih antibiotika, te posljedica toga je i smanjena terapijska alternativa liječenja jer se otpornost *A. baumannii* na postojeće svake godine povećava (Tab. 3.).

Tablica 3. Trend povećanja otpornosti *A. baumannii* na antibiotike od 2008. do 2011. godine u određenom broju uzoraka (n je broj uzoraka) (Xu i sur. 2013)

Antibiotici	2008 (n= 297)	2009 (n= 508)	2010 (n= 906)	2011 (n= 1120)
Cefuroksim	77,8	91,1	95,6	98,5
Ceftazidim	63,7	83,4	93,4	93,6
Cefotaksim	88,2	96,3	98,7	98,4
Cefepim	51,4	77,4	88,4	92,5
Cefperazon/ Sulbaktam	12,0	44,4	56,0	67,4
Piperacilin/ Tazobaktam	52,2	81,6	91,6	92,4
Amoksicilin/ Clavulanat	63,7	85,1	93,9	94,6
Imipenem	14,8	60,4	85,2	90,8
Meropenem	23,3	59,4	86,0	91,1
Amikacin	57,9	69,5	74,7	72,3
Aztreonam	72,9	92,5	94,6	97,6
Levofloksacin	56,8	74,9	79,6	87,3

Jedino rješenje izbjegavanja infekcija koje uzrokuje *A. baumannii* je blokirati bakterijske čimbenike virulencije ili jačati imunološku obranu domaćina, potiskujući ovu bakteriju na prethodnu ulogu kao rijetko patogene bakterije. Ovaj način se može poboljšati kombiniranjem s klasičnim pristupom antibiotskih sredstava, što će pojačati obranu domaćina (Lopez- Rojas i sur. 2013). Osim toga, kao potencijalni izvori bioaktivnih supstanci proučavaju se bakteriofagi, ekstrakti algi, gljiva i lišajeva te antimikrobni peptidi životinja (najčešće beskralješnjaka). Uz spomenute antimikrobne agense, veliku pažnju privlače i biljke kao

potencijali izvor kombinacije s antimikrobnom aktivnošću. Najčešći predmet istraživanja su eterična ulja i biljni ekstrakti te njihove bioaktivne komponente (Aleksić 2016).

4 Literatura

1. Aleksić V, 2016. Osjetljivost multiplo rezistentnih sojeva Acinetobacter baumannii na nekonvencionalne antimikrobne agense. *Prirodoslovno-matematički fakultet u Novom Sadu*, 23-44.
2. Abram M, 2016. Mikrobiologija. P2 Patogeneza i Sterilizacija. Predavanja, Medicinski fakultet, Mostar: poveznica http://med.mefmo.ba/eucenje/claroline/document/document.php?cmd=exChDir&file=L1ByZWRhdmFuamE%3D&cidReset=true&cidReq=MIK3G
3. Ali H M, Salem M Z M, El Shikh M S, Megeed A A, Alogaibi Y A, Talea I A, 2017. Investigation of the Virulence Factors and Molecular Characterization of the Clonal Relations of Multidrug- Resistant Acinetobacter baumannii Isolates. *Journal of AOAC International* **100(1)**, 152-158.
4. Berlanga M i Guerrero R, 2016. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microbial cell factories* **15:165**, 1-11.
5. Bjarnsholt T, Ciofu O, Molin S, Givskov M, Høiby N, 2013. Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed?. *Nature Reviews Drug Discovery* **12**, 791–808.
6. Center for Biofilm Engineering, 2003. Biofilm Basics. Section 4: What are key charasteristics of biofilms? Montana State University, Bozeman: poveznica http://www.biofilm.montana.edu/biofilm-basics/
7. Di Domenico E G, Farulla I, Prignano G, Gallo M T, Vespaziani M, Cavallo I, Sperduti I, Pontone M, Bordignon V, Cilli L, De Santis A, Di Salvo F, Pimpinelli F, La Parola I L, Toma L, Ensoli F, 2017. Biofilm is a Major Virulence Determinant in Bacterial Colonization of Chronic Skin Ulcers Independently from the Multidrug Resistant Phenotype. *International journal of molecular science* **18(5)**, Paper no. 1077.
8. Donlan R M, 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging infectious diseases* **8(9)**, 881-890.

9. Đekić Malbaša J, 2017. Faktori rizika i javnozdravstveni značaj infekcije krvi izazvane multirezistentnim bakterijama Acinetobacter spp. *Medicinski fakultet Novi Sad* 2-29.
10. Goić Barišić I, 2012. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii (MRAB)- ten years after the onset of these isolates in Croatia. *Croatian Journal of Infection* **32(2)**,67-70.
11. Horowitz B Z, 2005. Botulinum Toxin. *Critical care clinics* **21(4)**, 825-839.
12. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator R D, 2012. Acinetobacter baumannii; An emerging opportunistic pathogen. *Virulence* **3(3)**, 243-250.
13. Jamal M, Tasneem U, Hussain T, Andleeb S, 2015. Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology* **4(3)**, 1-14.
14. Joshi S G, Litake G M, Niphadkar K B, Ghole V S, 2003. Multidrug resistant Acinetobacter Baumannii isolates from a teaching hospital. *Journal of Infection and Chemotherapy* **9(2)**, 187-190.
15. Kučišec- Tepeš N, 2016. The Role of antiseptics and strategy of Biofilm removal in Chronic wound. *Acta medica Croatica* **70(1)**, 33-42.
16. Lopez- Rojas R, Smani Y, Pachon J, 2013. Treating multidrug- resistant Acinetobacter baumannii infection by blocking its virulence factors. *Expert review of anti- infective therapy* **11(3)**, 231-233.
17. Roca I, Espinal P, Vila Farres x, Vila J, 2012. The Acinetobacter baumannii oxymoron: commensal hospital dweller turned pan- drug- resistant menace. *Frontiers in microbiology* **23(3)**, 148.
18. Sauer K, Camper A K, Ehrlich G D, Costerton J W, Davies D G, 2002. Pseudomonas aeruginosa Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology* **184(4)**, 1140-1154
19. Science Source Images Art Collections: poveznica https://fineartamerica.com/featured/1-acinetobacter-baumannii-sem-science-source.html
20. Subhadra B, Oh M H, Choi C H, 2016. Quorum sensing in Acinetobacter: with special emphasis on antibiotic resitance, biofilm formation and quorum quenching. *AIMS Microbiology* **2(1)**, 27-41
21. Vraneš J, 2013. Patogeneza bakterijskih infekcija. U: Medicinska mikrobiologija. Ed. Kalenić S, Medicinska naklada, Zagreb, Hrvatska, pp. 86-97

22. Vraneš J, Leskovar V, 2009. Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju. *Medicinski Glasnik* **6(2)**, 147-164.
23. Xu T, Wenying X, Guodong R, Shiyang P, Huang P, Gu B, 2013. A 4-year surveillance of antimicrobial resistance patterns of Acinetobacter baumannii in a university-affiliated hospital in China. *Journal of thoracic disease* **5(4)**, 506-512.
24. http://www.nalaz.org/v2/bs/biofilmovi/
25. http://miloc.hr/rectorkovi-savjeti-klima/vijest/to-su-biofilmovi-i-kako-nastaju/

5 Sažetak

Biofilm je sve aktualnija tema i sve više se istražuje, a veće razumijevanje biofilma trebalo bi dovesti do novih, učinkovitijih strategija kontrole i poboljšanja liječenja pacijenata. Trend porasta rezistentnosti biofilma na antibiotike postaje sve ozbiljniji problem, a rješenje se pokušava pronaći kombinacijom različitih mjera poput izbjegavanja infekcija, blokiranja bakterijskih čimbenika virulencije ili pojačavanja imunološke obrane domaćina, potiskujući bakterije u biofilmu na prethodnu ulogu kao fakultativne ili rijetko patogene bakterije. Cilj rada je bio opisati najznačajnija svojstva biofilma: od procesa njegovog nastajanja, preko rasprostiranja u okoliš, kao uzročnika virulencije kod bakterija te rezistentnosti na antibiotike. Težište rada bilo je na biofilmovima koji su nastali djelovanjem bakterije *Acinetobacter baumannii*.

6 Summary

Biofilm is an important topic and there is more and more research in this area. A better understanding of biofilm should lead to new, more effective strategies for controlling and improving treatment of patients. The increasing trend of a biofilm resistance to antibiotic treatment become more and more serious problem, and the solution is to find a combination of different measures such as avoiding infections, blocking the factors of a bacterial virulence, or the host immunity increasing by suppressing bacterial cells in biofilm to reduce their pathogenicity. The aim of the paper was to describe the most important biofilm properties: from the process of its formation, through migration to the environment, as a bacterial virulence agent and and biofilm antibiotic resistance. The focus of the theses was on biofilms produced by the *Acinetobacter baumannii*.