

The significance of bacterial
and fungal biofilms in the
veterinary practice

Literature review

Veres Adrienn Mercédesz
Jerzsele Ákos*

A. M. Veres
Á. Jerzsele*

SZIE ÁOTK Gyógyszertani és
Méregtani Tanszék
H-1078 Budapest, István u. 2.

*e-mail: jerzsele.akos@aotk.szie.hu

A baktériumok és gombák által képzett biofilmek jelentősége az állatgyógyászatban

Irodalmi összefoglaló

BAKTERIOLÓGIA

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők irodalmi adatok alapján ismertetik a baktériumok és gombák biofilmképzésének folyamatát, klinikai jelentőségét. A biofilmek olyan extracelluláris mátrixba ágyazott mikrobatelepek, amelyeknek élettani sajátosságai eltérnek a szabadon élő planktonikus alakokétól, és jóval ellenállóbbak a környezeti tényezőkkel, így például az antibiotikumokkal, fertőtlenítőszerrel szemben. A bakteriális biofilmek humán orvosi jelentőségük mellett az állatgyógyászatban főleg a terápiarezisztens bőr-, hallójárat-, és tőgygyulladások esetében kerülnek előtérbe. A szerzők a dolgozatban a bakteriális biofilmek szerkezeti felépülését annak szabályozó folyamatait mutatják be, továbbá az ezek ellen felhasználható biofilmellenes részleteiben tárgyalják.

SUMMARY

The authors present the process of bacterial and fungal biofilm formation and its clinical significance, based on literature data. Biofilms are microorganism colonies embedded in an extracellular matrix, where microbes differ in physiology compared to their free-living planktonic counterparts. Biofilms are more resilient against environmental factors, including antibiotics and antiseptics. Besides their importance in human medicine they are primarily found in therapy resistant skin, ear and mammary gland infections in the veterinary field. The authors present the structural development, and the regulatory mechanisms of biofilm formation, and in addition, the usage of anti-biofilm agents in the veterinary medicine.

A biofilmek olyan mikrobatelepek, amelyek valamilyen extracelluláris mátrixba (extracellular polymeric substances, EPS) ágyazottan vonják be élő szövetek, szerves vagy szervetlen anyagok felületét (16).

A BIOFILMEK KIALAKULÁSA

A mátrixba ágyazott mikrobák nagy különbsége és előnye a planktonikus formához képest, hogy az így maguk körül kialakított életterek szerkezeti egységként, ill. védekező rendszerként működnek a folyamatosan változó, kedvezőtlen környezeti hatásokkal szemben. Az élő szervezetben ez elsősorban az immunrendszerrel, ill. az antibiotikumokkal szembeni védekezést jelenti (57). Több baktérium- és gombafaj is képes biofilm képzésére az élő szervezetekben, ilyenek például a *Pseudomonas aeruginosa*, a *Staphylococcus*-fajok, a *Riemerella anatipestifer*, a *Malassezia pachydermatis* és a *Candida albicans* (17, 28, 57). A biofilmek máig főleg humán gyógyászati viszonylatban kerültek górcső alá, ahol nagy problémát okoznak a tüdő tisztás fibrózisában szenvedő, ill. a katéterezett és az implantátumot kapott betegeknél (53). Állatorvosi területen legfőképpen a terápiarezisztens fül- és bőrgyulladások, ill. szarvasmarha-tőgygyulladások esetében kell figyelembe venni a jelenlétüket (33, 34).

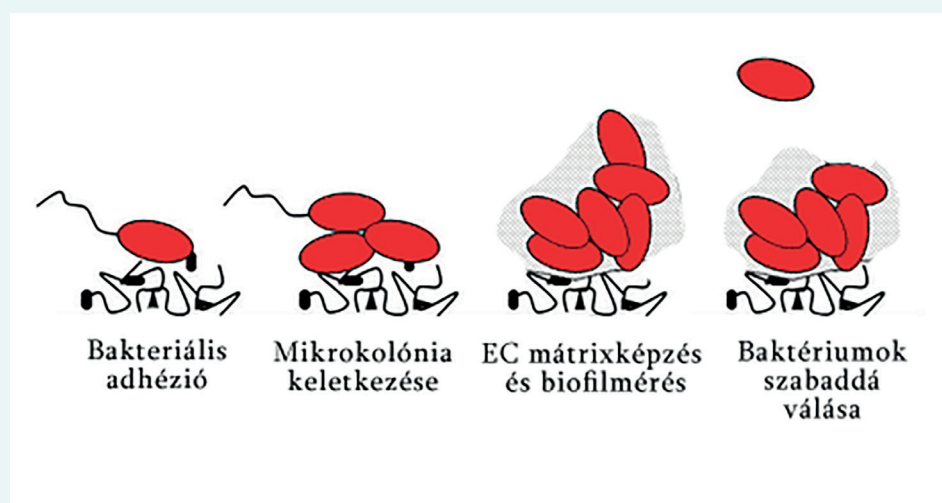
A biofilmek kialakulásának négy szakaszát különíthetjük el (1. ábra). Első lépésként a planktonikus mikrobák kitapadnak a felülethez és egymáshoz a IV-es típusú csillók, ostorok és a Psl poliszacharid segítségével (2. ábra). Innen kezdve a biofilm kialakulása fluoreszcensen jelölt lektinokkal a Psl szintézis menete szerint láttatható. A háromdimenziós mikrobatelep létrejötte a következő komplex folyamat (3. ábra), amelyet az EPS-mátrix felépülése jellemez, és határoz meg a közben zajló biokémiai és genetikai változásokkal (58). Ebben a fázisban a Psl főleg a széli részekben helyeződik a már gomba alakú telepben, ill. pókhálóhoz hasonló szerkezetű struktúrát hoz létre (40, 41, 54). A biofilm érési fázisa során a környezeti igények szerinti génkifejeződés zajlik az ennek megfelelő morfológia kialakításával (4. ábra). Amint a biofilm felvesz egy a környezeti igényeknek megfelelő szerkezeti és szervezeti egységet, a baktériumok közötti kommunikáció, a quorum sensing (QS) hatására elindul a végső fázis, a sejtszóródás. Ezzel egy körfolyamatot alkotva a biofilm fennmaradását, további planktonikus alakok kitapadását és a háromdimenziós terjeszkedését teszi lehetővé (42).

A biofilmek kialakulásának 4 szakasza különíthető el:

- kitapadás
- mikrokolónia-képzés
- a biofilm érése
- a baktériumok szabaddá válása

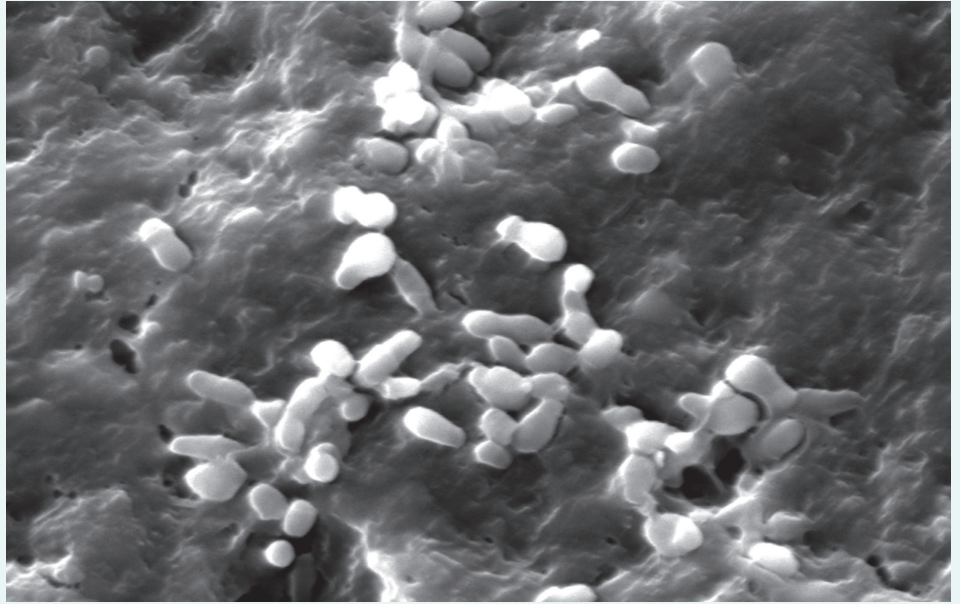
1. ÁBRA. A biofilmképzés fázisai: kitapadás, mikrokolónia-képzés, biofilm érése és a biofilmből a baktériumok szabaddá válása

FIGURE 1. The stages of biofilm formation: adhesion, microcolony formation, biofilm maturation and release of planktonic bacteria



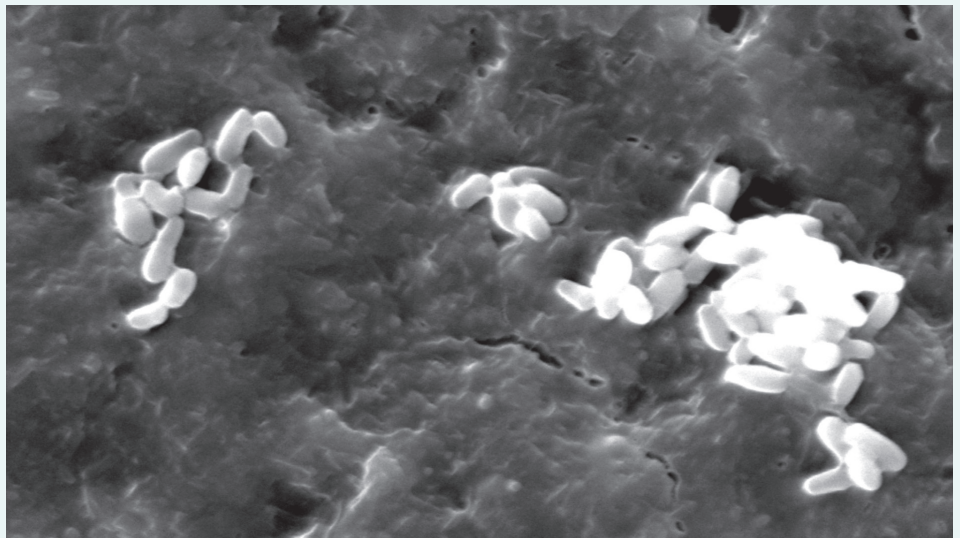
2. ÁBRA. A biofilmképzés kitapadási (adhéziós) fázisa *P. aeruginosa* esetén
Pásztázó elektronmikroszkópos felvétel,
2500×-os nagyítás

FIGURE 2. Adhesion phase of biofilm formation in case of *P. aeruginosa*
Scanning electron micrograph, 2500× magnification



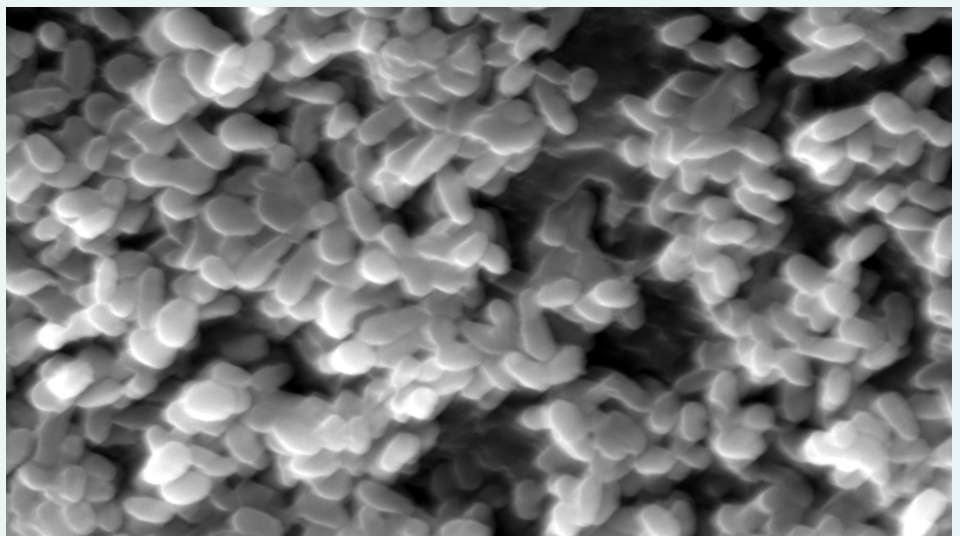
3. ÁBRA. Mikrokolónia képződése a biofilmképzés 2. fázisában *P. aeruginosa* esetén
Pásztázó elektronmikroszkópos felvétel,
2500×-os nagyítás

FIGURE 3. Microcolony formation in case of *P. aeruginosa* in the second phase
Scanning electron micrograph, 2500× magnification



4. ÁBRA. Az érett biofilm kialakulása *P. aeruginosa* esetén
Pásztázó elektronmikroszkópos felvétel,
2500×-os nagyítás

FIGURE 4. Mature biofilm formation in case of *P. aeruginosa*
Scanning electron micrograph, 2500× magnification



A BIOFILMEKET ALKOTÓ MOLEKULÁK

A *P. aeruginosa* biofilmképzését kutatták a legtöbbet

A *Pseudomonas aeruginosa* Gram-negatív fakultatív patogén baktérium, amelynek biofilmjei a legtöbbet kutatták, mátrixösszetétel tekintetében modellnek tekinthetők (42, 58). Ezt legalább háromféle poliszacharid: a Psl, a Pel és az alginát poliszacharid, ezeken felül extracelluláris DNS, különböző fehérjék és fehérjeszerű bakteriális felületi képletek (ostorok, csillók, CdrA adhezin és Cup fimbriák) alkotják. A baktériumok az acil-homoszerin-lakton rendszereken alapuló quorum sensing (QS, helyi populációsűrűség-érzékelés, lásd később) következtében ezeket az anyagokat a környezeti viszonyoknak megfelelő arányban és jellemző módon rendeződve termelik maguk köré, amelyek így szerkezeti vázát adnak, védelmi és tápláló funkciót látnak el, és mint rezisztenciafaktor viselkednek a baktérium ellen alkalmazott antibiotikumokkal szemben (42).

A Psl poliszacharid központi szerepet játszik a mátrix felépítésében

A mátrix szerkezetének kialakításában és fenntartásában a Psl poliszacharid játszik központi szerepet. A kezdeti sejt-sejt, ill. sejt-felület kapcsolat és megtapadás, majd az elsődleges biofilm létrejöttében alapvető jelentőségű. A háromdimenziós mátrixban hálózatot alkot, a széli részeken helyeződve pedig a sejtszóródást, továbbterjedést teszi lehetővé. Szignálmolekulaként szolgál a további biofilmképzéshez, ugyanis két diguanilát-cikláz enzimet (SiaD, SadC) stimulálva a másodlagos jelvivő molekula, a ciklikus-di-guanozin-monofoszfát (c-diGMP) szintjét emeli, amely pozitív visszacsatolásként fokozza a Psl-termelést. A Psl csökkenti továbbá a gazdaszervezet ellenálló képességét a neutrophil granulocyták aktivitásának gátlásával (58). Szerepe van az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakításában, így pl. a Psl közvetlenül képes rezisztenciát kialakítani a biofilm inhibitor poliszorbát-80-nal szemben (60). Tekintve a Psl szerteágazó funkcióját a mátrixban, szerkezetének és működésének vizsgálata kulcsfontosságú a biofilmek megismerésében és a biofilmel lenes védekezés kialakításában.

A Pel poliszacharid a baktériumsejtek aggregációját segíti

A Pel poliszacharid a baktériumsejtek aggregációját segíti, a kezdeti kitapadás egyik fontos szabályozója, akár egyéb adhezinek (pl. IV-es típusú csilló, T4P) hiányában is. A Psl hiányában vagy kis koncentrációja mellett nő a jelentősége, ilyenkor ugyanis segíti a sejt-sejt kapcsolódásokat, és erősíti az aminoglikozidokkal szembeni rezisztencia kialakulását (58).

Az alginát poliszacharid a tápanyag-, az elektrolit- és a vízhátartásban kulcsfontosságú

A *Pseudomonas aeruginosa* egyetlen mátrixalkotójának korábban az alginát poliszacharidot tartották, amely viszkózus nyálka jellege révén egyedülálló védelmet ad, szerkezeti szerepét a hialuronsavéhoz hasonlítják. Jelenléte a tápanyag-, az elektrolit- és a vízhátartásban kulcsfontosságú (42). Képes megkötni a neutrophil granulocytákból és makrofágokból felszabaduló szabadgyököket, gátolja a bekebelezést fokozó opszoninnal jelölt antigén-antitestkomplex fagocitózist, és hozzájárul az antibiotikumok elleni rezisztencia kialakulásához (58).

A biofilmképzés szerveződését, mozgásának koordinálását végzi az extracelluláris DNS

A biofilmképzés szerveződését, mozgásának koordinálását végzi az extracelluláris DNS (22). Ez egy véletlenszerű kromoszomális DNS, amely segíti továbbá a sejt-sejt kapcsolatok létrejöttét, különösen a mátrix széli részein és az alapján (56). A baktériumok tápanyagaként is szolgálhat a biofilm építésének folyamatában (18), ill. gyulladáshoz mediátorként gyulladást válthat ki (20).

A fehérje és fehérjeszerű képletek elsősorban a biofilm képződésének bevezető fázisában segítik a kolónia kialakulását, stabilizálják azt. A kezdeti kulcs-adhezin a CdrA fehérje, amely a Psl poliszachariddal karöltve kezdi el a biofilm építését. A planktonikus *Pseudomonas aeruginosa* csillók segítségével úszó, rajzó mozgásra képes, ugyanakkor ezek a sejt-felületi képletek az adhézióban is segítik. A már említett T4P csilló működése révén alakul ki a gomba alakú mikrokolónia. Ugyanakkor a csillók és ostorok nem feltétlen szükségesek a kezdeti biofilm kialakulásához, jelenlétük esetleges, többek között a biofilm táplálásában van szerepük (42, 58).

A QUORUM SENSING (QS) ÉS A BIOFILMKÉPZÉS SZABÁLYOZÁSA

A quorum sensing a baktériumsejtek közötti inger-válasz kommunikáció, amely a biofilmképzés fontos eleme

A biofilmek felépülését több szabályozási rendszer együttes hatása irányítja, amelyek feltérképezése máig gyakran kutatott terület. Ennek pontos ismerete segítséget nyújthat a biofilmek feltöréséhez, ill. a célzott baktériumellenes terápiához (58). A QS a baktériumsejtek közötti inger-válasz kommunikáció, amelynek során a biofilmekben ún. autoinducerek (AI), a detektálást segítő jelmolekulák kiválasztásával és érzékelésével képesek a populáció viselkedésének megváltoztatására a populáció sűrűségének megfelelően a las és az rhl rendszereken ill. bizonyos gének kifejeződésén keresztül. A rendszer működési feltétele, hogy a résztvevők képesek legyenek megbecsülni a többi résztvevő számát, és egyformán reagáljanak a detektált komponensek értékeinek eltéréseire (45). Számos, a biofilmképzésen kívüli, biológia rendszer működik a QS segítségével, úgymint a biolumineszcencia, a virulenciafaktorok, a sziderofórok kiválasztása és az államalkotó rovarok fészkelése (11, 19, 55).

A leginkább kutatott Gram-negatív baktériumoknál nagyszámú (kb. 200-300) gén kifejeződésében történik jelentős változás a biofilmképzés során. Ez két nagy, ún. acil-homoszerin-lakton (AHL) rendszeren keresztül történik: ezek a LasR/LasI, ill. a RhIR/RhII rendszerek (45, 58). A Las-rendszer által termelt 3-oxo-C12-HSL szignálmolekula felel a biofilmképzés kezdeti, differenciálódási fázisáért, ezzel szemben a RhIR/RhII rendszer irányítja az érett biofilm fenntartását és túlélését (16, 46). A felületi poliszacharidok QS által irányított képződése és bomlása a LasR/I rendszer által kontrollált tirozin-foszfátáz (TpbA) enzimen keresztül csökkenti a Pel poliszacharid mennyiségét. A központi szerepet játszó c-di-GMP jelzőmolekula mennyiségével a QS negatív korrelációban áll, nagy koncentrációja esetén a mátrixba ágyazott alakok képződésének kedvez a mátrix poliszacharidok szintézisével (58). A c-di-GMP stimulálja az adhezinek szintézisét, az exopoliszacharid-irányított biofilmpépülést, csökkenti a baktériumok mozgékonyágát, így azok a planktonikus formából mátrixban „ülő” formává alakulnak, tehát virulenciafaktorok tekinthető (14, 25, 32). Másodlagos jelvivőként kis koncentrációja növeli a baktériumok motilitását, a flagellák (ostor) és a fimbriák kialakítását, ill. a virulenciagének kifejeződését (58).

Egy-egy biofilmfejlődési szakaszra adott poliszacharid-összetétel jellemző, amely folyamatosan változhat a környezeti hatásokhoz igazodva

A biofilmmátrix egyéb szabályozó mechanizmusai közül az AlgC mediált folyamatok emelendők ki. Az AlgC, mint egy kettős funkciójú kapcsolóenzim a szénhidrát-prekursorok mennyiségének szabályozásával beállítja a poliszacharidok végső arányát és mennyiségét (41). Általánosságban elmondható, hogy az egyik típusú poliszacharid túltermelése a többi mennyiségének csökkenését vonja magával. Egy-egy biofilmfejlődési stádiumra adott poliszacharid-összetétel jellemző, amely folyamatosan változhat a környezeti hatásokhoz igazodva. A központi jelentőségű Psl poliszacharid önmagában jelzőmolekula funkciót lát el, pozitív visszacsatolással önmaga képződését serkenti (41, 42, 58).

A BIOFILMEK KIMUTATÁSA

A biofilmképző baktériumok elleni kezelés előfeltétele a baktériumtörzs azonosítása

A hatékony kezelés előfeltétele a biofilm képzésére alkalmas baktériumtörzs megbízható kimutatása. Különböző, főleg humán gyógyászatban használt módszerek állnak rendelkezésre, amelyek közül néhányat állatgyógyászati vonalon is alkalmaznak. Az egyik leginkább elterjedt kvantitatív kimutatási módszer a Microtiter Plate Teszt (MTP), amely a kezdeti kémcsöves kimutatási lehetőség továbbfejlesztett verziójaként vált gyakran alkalmazott módszerré (13). A 37 °C-on tripton-szója-levesben inkubált baktériumkultúrát hígítás után egy 96 lyukú mikrotitráló lemezen inkubálják újabb 24 óráig. Ezt követően kristályibolya-

festés, majd abszolút alkoholos oldás után a folyadékfázis optikai sűrűségét spektrofotométerrel mérik pozitív és negatív kontrollokat használva (59).

A Kongóvörös-agar (Congo Red Agar, CRA) Plate Teszt ezzel szemben kongóvörös festéssel jelzett tripton-szója szilárd hordozóanyagot használ, lehetővé téve a nyákat képző törzsek elkülönítését és a kialakított kolóniák közvetlen vizsgálatát. A szubjektív színelemzés miatt ez a módszer csak kvalitatív kimutatást tesz lehetővé (31).

Pseudomonas aeruginosa esetében a biofilm képződését jelző, így az eukarióta sejthez történő felületi kötődését kimutató eljárás a 2% D-mannóz jelenlétében vagy hiányában kialakuló *ex vivo* kötődés Hep-2 vagy HeLa sejtekhez. A módszer során a megfelelő inkubációs, mosási (PBS) és festési (Giemsa) fázisok után a sejteket optikai mikroszkóppal vizsgálják, és elbírálják az adhézió fokát (59).

A sejtek közötti poliszacharid adhezinek szintéziséért felelős *icaA* és *icaD* gének PCR-rel történő kimutatása megbízható és gyors biofilm-kimutatói lehetőség *Staphylococcus aureus* esetében (12, 15). A quorum sensing központi irányításáért felelős acil-homoszerin-laktonok, így a *las* és *rhl* gének ill. egyéb, a biofilm épülésében szerepet játszó MSCRAMM (mikrobaadhezív mátrix molekulákat felismerő felületi komponensek) gének kimutatása is egyértelmű indikátorai a biofilmek jelenlétének, ilyenek pl. a *cna*: kollagénekötő fehérje, az *ebpS*: elasztinkötő fehérje, az *fnbA* és *fnbB*: fibronectinkötő fehérjekötő gének (48).

Az egyre fejlettebb képalkotó eljárásoknak köszönhetően a biofilmek valós idejű (real time) vizsgálatára is lehetőség van áramlásos citometriával és/vagy konfokális scanning elektronmikroszkóppal. Ezekkel az eljárásokkal számos, a végeredményt befolyásoló labortechnikai hiba kiküszöbölhető, ill. a vizsgálatra fordított idő jelentősen lerövidíthető (13).

BIOFILMELENES HATÓANYAGOK

A biofilmek feltörésére és eltávolítására irányuló tanulmányok főként *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* és *Candida albicans* esetében valósultak meg, amelyek döntő többségükben humán orvosi vizsgálatok voltak (52). A humán gyógyászatban, ahol a biofilmek elsősorban beültetett katétereken, szívbillentyűkön fordulnak elő, szisztémás biofilmellenes terápia szükséges, amely során a toxicitás korlátozó tényező (13). Az állatgyógyászatban ugyanakkor helyileg alkalmazható szerek is számításba jöhetnek, hiszen biofilmek képződésével járó bakteriális fertőzések javarészt a háziállataink fülében, bőrén és a tejmirigyekben alakulnak ki. Az antibiotikumok és a biofilmellenes szerek helyi alkalmazása során kivédhető azok szisztémás hatása, így a toxicitás nem elsőrendű szempont (12, 33).

Ahogy a biofilm különböző fejlődési stádiumaiban eltérő szerkezetet és stabilitást mutat, úgy a biofilm feltörésére is eltérő módszereket használhatunk. Amint már az érett biofilmről beszélünk, különösen nehéz azokat a szokványosan használt antiszeptikumokkal eltávolítanunk a fertőzött területekről. Ideális anyagok lehetnek a biofilm keletkezését gátló vagy a planktonikus alakok mátrixba ágyazott formává alakulását megakadályozó enzimek, vegyületek (53, 58).

Legelső lépésként a mikrobakolónia felületi kitapadását szükségszerű megakadályozni. Humán orvoslásban a különböző műtéti eszközök és implantátumok felületét ezüstkolloiddal próbálták bevonni, hogy a biofilm létrejöttét gátolják. Ennek sikerességét bizonyítandó, hogy a máig bevett eljárás a biofilmellenes védelemben az eszközök teljes cseréje (39, 58). Ugyanígy a krónikusan fertőzött sebeknél, szöveti területeken a szövetek teljes műtéti eltávolítása lehet indokolt (58). A biofilm fejlődésének végső fázisában kialakuló és a későbbiekben fennálló mikrobaszóródást fokozhatjuk pl. nitrogén-monoxiddal, ezáltal jóval sérülékenyebb planktonikus mikroorganizmusokat létrehozva (5, 6). A laktoferrin a vas megkötésével és a IV-es típusú csillók

Az állatgyógyászatban a biofilmképző fertőzések leginkább a fülben, a bőrön és a tejmirigyben jelentkeznek

mozgásának fokozásával hat a kitapadás és a biofilm képződése ellen, egyes vassók pedig bontani is képesek a már létező filmeket. Ezek antibiotikumokkal kombinálva hatékony biofilmfeltörést eredményezhetnek (43, 49).

A különböző biofilm-ellenes vegyületek a biofilmképződés más-más szakaszaiban képesek hatni

Bizonyos enzimek használatával célzottan tudjuk befolyásolni a biofilmek fejlődésének egyes fázisait. Az enzimés kezelés előnye, hogy jól alkalmazhatóak helyileg mellékhatások előfordulásának nagy kockázata nélkül, emiatt ez egy gyakran alkalmazott módszer pl. a szarvasmarha tőgygyulladásainak kezelésében. Az Esp proteázoknak nagy jelentősége van a *Staphylococcus* biofilmek elleni védekezésben, ahol az immunrendszerre való fogékonyságért felelős fehérjéket teszik tönkre (29, 50, 51). A már felépült mátrixot bizonyos enzimekkel akár közvetlenül emészteni is tudjuk, így pl. a dezoxiribonukleáz (DNáz I) enzimkezelés során a mátrix egyik fontos strukturális elemét, az eDNS-t bontjuk, amely antibiotikumok egyidejű használatával hatékony biofilmképződést gátló hatású (3). Fokozza egyes antibiotikumok, így a doxiciklin és a levofloxacin terápiás hatását. Az alginát-liáz az alginát bontása mellett megnöveli az antibiotikumok, pl. az aminoglikozidok csoportjába tartozó gentamicin hatékonyságát a nyákképző *Pseudomonas aeruginosa* biofilmekben, amíg a makrolidokhoz tartozó azitromicin önmagában képes gátolni az alginát épülését (2, 26, 27).

Az intracelluláris jelzőmolekulák antagonizálása is egy fontos alappillére lehet a biofilmek elleni küzdelemnek. A cél, hogy a quorum sensing molekulák, elsősorban az acil-homoszerin-lakton rendszeren keresztüli (44, 47) termelődésének megakadályozásával vagy a felvevő receptoraik blokkolásával gátoljuk az érett biofilm kialakulását (30, 47).

Jelentős biofilmellenes hatása van bizonyos növényi vegyületeknek, ill. baktérium-anyagcsere termékeknek.

Egyes növényi kivonatoknak is jelentős biofilm-ellenes hatása van

A növényi kivonatok biofilmellenes hatását széles körben tanulmányozták. A resveratrol, amely többek között a japán keserűfű, *Polygonum cuspidatum* gyökeréből vonható ki, *Propionibacterium acnes* biofilm esetén 80%-os biofilmtömeg-csökkenést képes elérni, de az *Escherichia coli* és *Pseudomonas aeruginosa* biofilmekben is hatékony 5 µmol/l koncentrációban (37). A banaba, *Lagerstroemia speciosa* kivonata virulenciafaktorok, mint a Las enzimes család és pyoverdin termelődését gátolja 10 mg/ml koncentrációban. A bengál mandula, *Terminalia catappa* 50%-ban képes csökkenteni a LasA génkifejeződést. A gyömbér, *Zingiber officinale* aktív hatóanyaga a zingeron, gátolja a biofilmképzést és növeli a ciprofloxacin hatékonyságát *Pseudomonas aeruginosa* biofilmekben (36).

További biofilmellenes anyagokhoz tartoznak a poliaminok, mint pl. a norspermidin és a norspermin, amelyek a biofilm poliszacharid semleges és anionos funkciók csoportjaival képesek kapcsolódni, így megakadályozzák a biofilm növekedését *Staphylococcus aureus* és *Bacillus subtilis* esetében (9).

A baktériumok sejt közötti kommunikációjában központi szerepet játszó másodlagos jelvivő molekula, a c-di-GMP *Staphylococcus aureus* esetében specifikusan akadályozza a biofilmképzést és a kitapadást a HeLa sejtekhez (35). *In vivo* egér állatmodellen emlőmirigy-gyulladás esetén csökkenti a baktérium virulenciáját (10).

Az antibiotikumokkal szinergizáló citozán igen ígéretes biofilmképződést gátló szer számos baktériumfajnál (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas fluorescens*), ahol 93–96%-kal csökkenti a biofilm tömegét 24 órán belül (61).

A BIOFILMEK ANTIBIOTIKUMOKKAL SZEMBENI ÉRZÉKENYSÉGE

A humán gyógyászatban izolált *Pseudomonas aeruginosa* törzsek általában érzékenyek a fluorokinolonokra (ciprofloxacin, marbofloxacin, pradofloxacin) és

A szerzők *P. aeruginosa* esetén bizonyították hogy a biofilmképzés jelentősen csökkentette a vizsgált törzsek antibiotikum-érzékenységét

a β -laktámokra (pseudomonas-ellenes penicillinek, 3. generációs cefalosporinok, monobaktámok, karbapenemek), valamint az aminoglikozidokra (gentamicin, tobramicin, amikacin). A polimixinek hatékonysága kimagasló *Pseudomonas aeruginosa*val szemben. A *P. aeruginosa* kifejezett ab ovo ellenálló képessége, és nagyfokú változékonysága miatt azonban számos antibiotikummal szemben mutat rezisztenciát. Az állatorvosi gyakorlatban az érzékenység hasonló, a fluorokinolonok azonban kezdenek veszíteni hatékonyságukból (21), az aminoglikozidok pedig *in vitro* biofilmképzést képesek generálni (26). JERZSELE és mtsai (34) a planktonikus és biofilmben ágyazott *P. aeruginosa* törzsek antibiotikum-érzékenységét vizsgálva azt találták, hogy marbofloxacin, gentamicin, kolisztin és ezek kombinációinak használatakor a kombinációs (marbofloxacin-gentamicin, ill. marbofloxacin-kolisztin) kezelés szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult az önállóan alkalmazott marbofloxacinnal szemben, ill. a biofilmképzés jelentősen csökkentette a vizsgált törzsek antibiotikum-érzékenységét. AGARWAL és mtsai (1) ciprofloxacinra és gentamicinre vizsgálva a baktériumot négyszeres rezisztenciát mértek a biofilmben ágyazott formáknál. Az antibiotikumok, a biofilmet tápláló anyagok és az oxigén viszonylag könnyen bejutnak a biofilmben, de egyre beljebb haladva mikroaerofil vagy akár anaerob környezet is kialakulhat (8). Itt csökkenhet a tápanyagfelvétel, változhat a génkifejeződés, így akár az antibiotikum-érzékenység is, ebből kifolyólag a terápiára nem reagáló állandósult sejtek jöhetnek létre, ami továbbra is fenntartja a biofilmet (53). eltérés lehet az antibiotikumok hatékonyságában a biofilm széli és központi részein, így pl. a ciprofloxacin főleg a külső sejtrétegekben, a kolisztin a biofilm belsejében hatékony (23).

***S. aureus* esetén is megfigyeltek hasonló jelenséget**

Kérődzők fertőző betegségeiben, különösképpen tőgygyulladásában nagy jelentőségű kórokozó a *Staphylococcus aureus*, amely legtöbb esetben biofilmet képez a tejmirigyek mirigyhámsejtjein (4). AMORENA és mtsai (4) tizenegy különböző antibiotikum hatását vizsgálták a *S. aureus* biofilmképzésére különböző érési fázisban lévő és felületi táptalajon kialakuló biofilmek esetében. Azt találták, hogy minél fiatalabb biofilm esetén minél nagyobb koncentrációban használták az antibiotikumokat, annál nagyobb hatást gyakoroltak a biofilm életképességére. A foszfomicin, a cefuroxim, ezt követően a rifampicin, a penicillin és a ciprofloxacin volt jelentős hatással a biofilm életképességére. Ezzel szemben a gentamicin és a tobramicin kevésbé bizonyult hatásosnak. A kezelés során a biofilm belső sejtsorai javarészt érintetlenek maradtak, érésével előrehaladón a mátx egyre gyérült, míg a sejtsűrűség nőtt.

Biofilmben levő *M. pachydermatis* törzsek 90-96,7%-ban voltak rezisztensek a ketokonazolra, itrakonazolra és terbinafinra

A *Malessezia pachydermatis* szaprofita blasztokonídium-képző gomba, amely az egészséges bőrflóra része, de bizonyos körülmények között idült, ill. visszatérő jellegű fül- és bőrgyulladást tud okozni (33). Humán viszonylatban a *Candida albicans*szal együtt intravénás katéterek felületén biofilmet képes kialakítani, a vérpályába kerülve pedig vérfertőzést okozhat (38). Állatorvosi vonalon kezelésükre poliéneket, azolokat, allilaminokat és klórhexidint használhatunk (7). FIGUEREDO és mtsai vizsgálták a *M. pachydermatis* törzsek érzékenységét ketokonazolra, itrakonazolra és terbinafinra (17). A planktonikus formák 0-8,3%-ban voltak rezisztensek, amíg a biofilmben ülő formák esetében ez az arány 90-96,7%-os volt. Klinikailag megnyilvánuló kutya külsőfül gyulladásából származó mintákat vizsgálva JERZSELE és mtsai hasonló eredményre jutottak irtakonazol és ketokonazol esetén (33).

A számos gombaellenes hatóanyagra rezisztenciát mutató *Candida albicans* biofilmek felelősek javarészt az implantátum-fertőzésekért a humán gyógyászatban (24). A növényi alkaloid berberin és a gombaellenes azolok szinergizáló hatást mutatnak *Candida*-fajokon történő együttes alkalmazásukkor, holott az azolok (flukonazol, mikonazol) önálló használatakor azokra gyakran rezisztenciát mutatnak (57).

A nem csupán a humán gyógyászatban, hanem állatorvosi területen is nagy terápiás nehézségeket okozó biofilmképződés elleni hatékony fellépés előfelté-

tele a biofilmek struktúrájának, a felépülést szabályozó mechanizmusainak, a beágyazott mikrobák élettani sajátosságainak és a környezetének mélyreható ismerete. Állatorvosi vonalon a főleg helyi gyulladós folyamatokban megjelenő biofilmképzés visszaszorítása és megakadályozása a fő célunk a lokálisan alkalmazható biofilmellenes szerekkel, ill. antibiotikumokkal, antimikotikumokkal. A fent említett élettani sajátosságokat figyelembe véve új, hatékony gyógyszer-kombinációk kialakításával a használt mikrobaellenes szerek mennyisége, így a velük járó rezisztencia terjedése, vagy akár élelmiszer-higiéniai kockázat is csökkenthető.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetüket fejezik ki Kovács ÁRPÁD laborvezető Úrnak a pásztázó elektronmikroszkópos felvételekért.

IRODALOM

1. AGARWAL, G. – KAPIL, A. et al.: *In vitro* efficacy of ciprofloxacin and gentamicin against a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and its free-living forms. *Natl. Med. J. Ind.*, 2005. 18. 184–186.
2. ALKAWASH, M. A. – SOOTHILL, J. S. et al.: Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Acta Path. Micro. Im.*, 2006. 114. 131–138.
3. ALLESEN-HOLM, M. – BARKEN, K. B. et al.: A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.*, 2006. 59. 1114–1128.
4. AMORENA, B. – GRACIA, E. et al.: Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 1999. 44. 43–45.
5. BARRAUD, N. – SCHLEHECK, D. et al.: Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *J. Bacteriol.*, 2009 a. 191. 7333–7342.
6. BARRAUD, N. – STOREY, M. V. et al.: Nitric oxide-mediated dispersal in single- and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms. *Microb. Biotechnol.*, 2009. 2. 370–378.
7. BOND, R.: Superficial Veterinary Mycoses. *Clin. Dermatol.*, 2010. 28. 226–236.
8. BORRIELLO, G. – WERNER, E. et al.: Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob. Agents Ch.*, 2004. 48. 2659–2664.
9. BÖTTCHER, T. – KOLODKIN-GAL, I. et al.: Synthesis and activity of biomimetic biofilm disruptors. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013. 135. 2927–2930.
10. BROUILLETTE, E. – HYODO, M. et al.: 3',5'-cyclic diguanylic acid reduces the virulence of biofilm-forming *Staphylococcus aureus* strains in a mouse model of mastitis infection. *Antimicrob. Agents Ch.*, 2005. 49. 3109–3113.
11. CAMILLI, A. – BASSLER, B. L.: Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, 2006. 311. 1113–1116.
12. CASTRO MELO, P. – FERREIRA, L. M. et al.: Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Braz. J. Microbiol.*, 2013. 44. 119–124.
13. COENYE, T. – NELIS, H. J.: *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *J. Microbiol. Meth.*, 2010. 83. 89–105.
14. COTTER, P. A. – STIBITZ, S.: C-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2007. 10. 17–23.
15. CRAMTON, S. E. – GERKE, C. et al.: The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.*, 1999. 67. 5427–5433.
16. DAVIES, D. G. – PARSEK, M. R. et al.: The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 1998. 280. 295–298.
17. FIGUEROA, A. L. – CAFARCHI, C. et al.: Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* biofilm. *Med. Mycol.*, 2013. 51. 863–867.
18. FINKEL, S. E. – KOLTER, R.: DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *J. Bacteriol.*, 2001. 183. 6288–6293.
19. FUQUA, C. – WINANS, S. C. et al.: Consensus and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1996. 50. 727–751.
20. FUXMAN BASS, J. I. – RUSSO, D. M. et al.: Extracellular Dna a major proinflammatory component of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Immunol.*, 2010. 184. 6386–6395.
21. GÁLFI P. – CSIKÓ Gy. – JERZSELE Á.: *Állatorvosi Gyógyszertan III.* Robbie-Vet Kft. Budapest, 2012. 81–83; 206–208. 134–138.
22. GLOAG, E. S. – TURNBULL, L. et al.: Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013. 110. 11541–11546.
23. HAAGENSEN, J. A. J. – KLAUSEN, M. et al.: Differentiation and distribution of colistin- and sodium dodecyl sulfate-tolerant cells in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Bacteriol.*, 2007. 189. 28–37.
24. HAWSER, S. P. – DOUGLAS, L. J.: Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrob. Agents Ch.*, 1995. 39. 2128–2131.
25. HENGGE, R.: Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat. Rev.*, 2009. 7. 263–273.
26. HOFFMAN, L. R. – D'ARGENIO, D. A. et al.: Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 2005. 436. 1171–1175.

27. HOFFMANN, N. – LEE, B. et al.: Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in cftr^{-/-} mice. *Antimicrobial Agents Ch.*, 2007. 51. 3677–3687.
28. HU, Q. – HAN, X. et al.: Characterization of biofilm formation by *Riemerella anatipestifer*. *Vet. Microbiol.*, 2010. 144. 429–436.
29. IWASE, T. – UEHARA, Y. et al.: *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*, 2010. 465. 346–349.
30. JACOBSEN, T. H. – VAN GENNIP, M. et al.: Ajoene, A sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. *Antimicrob. Agents Ch.*, 2012. 56. 2314–2325.
31. JAIN, A. – AGARWAL, A.: Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal *Staphylococci*. *J. Microbiol. Meth.*, 2009. 76. 88–92.
32. JENAL, U. – MALONE, J.: Mechanisms of cyclic-di-gmp signaling in bacteria. *Annu. Rev. Genet.*, 2006. 40. 385–407.
33. JERZSELE, Á. – GYETVAI, B. – CSERE, I. – GÁLFI, P.: Biofilm formation in *Malessezia pachydermatis* strains isolated from dogs decreases susceptibility to ketoconazole and itraconazole. *Acta Vet. Hung.* Doi: 10.1556/Avet.2014.019.
34. JERZSELE Á. – ALBRECHT V. – GÁLFI P. – GYETVAI B.: A biofilmképzés hatása antibiotikumokkal szembeni in vitro érzékenységre kutyából izolált *Pseudomonas aeruginosa* törzsekénél. *Magy. Állatorv. Lapja*, 2015. 1. 45–52.
35. KARAOLIS, D. K. R. – RASHID, M. et al.: C-di-GMP (3'-5'-cyclic diguanylic acid) inhibits *Staphylococcus aureus* cell-cell interactions and biofilm formation. *Antimicrob. Agents Ch.*, 2005. 49. 1029–1038.
36. KUMAR, L. – CHHIBBER, S. et al.: Zingerone inhibit biofilm formation and improve antibiofilm efficacy of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* Pao1. *Fitoterapia*, 2013. 90. 73–78.
37. LEE, J. H. – KIM, Y. et al.: Resveratrol oligomers inhibit biofilm formation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Nat. Prod.*, 2014. 77. 168–172.
38. LEONIDOU, L. – GOGOS, C. A.: Catheter-related bloodstream infections: catheter management according to pathogen. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 2010. 36. 26–32.
39. LI, W. R. – XIE, X. B. et al.: Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010. 85. 1115–1122.
40. MA, L. – CONOVER, M. et al.: Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Plos Pathog.*, Doi: 10.1371/journal.ppat.1000354.
41. MA, L. – WANG, J. et al.: Synthesis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix exopolysaccharides is post-transcriptionally regulated. *Environ. Microbiol.*, 2012. 14. 1995–2005.
42. MANN, E. E. – WOZNIAK, D. J.: *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *Fems Microbiol Rev.*, 2012. 36. 893–916.
43. MUSK, D. J. – BANKO, D. A. et al.: Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms Of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Biol.*, 2005. 12. 789–796.
44. RAMPIONI, G. – LEONI, L. et al.: The art of antibacterial warfare: deception through interference with quorum sensing-mediated communication. *Bioorg. Chem.*, 2014. 55. 60–68.
45. SAKURAGI, Y. – KOLTER, R.: Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 2007. 189. 5383–5386.
46. SAUER, K. – CAMPER, A. K. – EHRLICH, G. D. et al.: *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes During Development As A Biofilm. *J. Bacteriol.*, 2002, 184. 1140–1154.
47. SCUTERA, S. – ZUCCA, M. et al.: Novel approaches for the design and discovery of quorum-sensing inhibitors. *Expert Opin. Drug Dis.*, 2014. 9. 353–366.
48. SIMOYOKI, H. – HYVÖNEN, P. et al.: Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase negative *Staphylococci* associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Vet. Microbiol.*, 2012. 158. 344–352.
49. SINGH, P. K. – PARSEK, M. R. – GREENBERG, E. P. et al.: A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, 2002. 417. 552–555.
50. SUGIMOTO, S. – IWASE, T. – SATO, F. et al.: Cloning, expression and purification of extracellular serine protease Esp, a biofilm-degrading enzyme, from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Appl. Microbiol.*, 2011. 111. 1406–1415.
51. SUGIMOTO, S. – IWAMOTO, T. – TAKADA, K. et al.: *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J. Bacteriol.*, 2013. 195. 1645–1655.
52. TARASZKIEWICZ, A. – FILA, G. et al.: Innovative strategies to overcome biofilm resistance. *BioMed. Res. Int.*, 2013. Doi: 10.1155/2013/150653.
53. TAYLOR, P. K. – YEUNG, A. T. Y. et al.: Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. *J. Biotechnol.*, 2014. 191. 121–130.
54. WANG, S. – PARSEK, M. R. et al.: A spider web strategy of type iv pili-mediated migration to build a fibre-like psl polysaccharide matrix in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.*, 2013. 15. 2238–2253.
55. WATERS, C. M. – BASSLER, B. L.: Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Bi.*, 2005. 21. 319–346.
56. WEBB, J. S. – THOMPSON, L. S. et al.: Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.*, 2003. 185. 4585–4592.
57. WEI, GUO-XIAN – XU, X. et al.: *In vitro* synergism between berberine and miconazole against planktonic and biofilm *Candida* cultures. *Arch. Oral Biol.*, 2011. 56. 565–572.
58. WEI, Q. – MA, L. Z.: Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013. 14. 20983–21005.
59. ZARANZA, A. V. – MORAIS, F. C. et al.: Antimicrobial susceptibility, biofilm production and adhesion to hep-2 cells of *P. aeruginosa* strains isolated from clinical samples. *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, 2013. 4. 98–106.
60. ZEGANS, M. E. – WOZNIAK, D. et al.: *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl promotes resistance to the biofilm inhibitor Polysorbate 80. *Antimicrob. Agents Ch.*, 2012. 56. 4112–4122.
61. ZHANG, Q. Q. – YE, K. P. et al.: Inhibition of biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* by an acylated homoserine lactones-containing culture extract. *Food Sci. Technol.-Leb.*, 2014. 57. 230–235.