

Infekcije povezane s biofilmom

Kotur, Vanja

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:180614>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

STUDIJ MEDICINA

Vanja Kotur

INFEKCIJE POVEZANE S BIOFILMOM

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

STUDIJ MEDICINA

Vanja Kotur

INFEKCIJE POVEZANE S BIOFILMOM

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

Mentorica rada: prof. dr. sc. Maja Abram, dr. med.

Diplomski rad ocjenjen je dana _____ u/na _____

_____ pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Darinka Vučković, dr. med.
2. prof. dr. sc. Ivana Gobin, dipl.sanit.ing
3. doc. dr. sc. Mirna Mihelčić, dr. med. vet.

Rad sadrži 37 stranica, 4 slike i 23 literaturna navoda.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Maji Abram, dr. med. na stručnom vodstvu, pristupačnosti i ažurnosti tijekom izrade ovog diplomskog rada. Posebno želim zahvaliti i svojim roditeljima u kojima sam tijekom cijelog studija pronašao bezuvjetnu podršku i razumijevanje. Također se zahvaljujem i svojoj Marijani koja mi je olakšala i uljepšala dane provedene na fakultetu.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. SVRHA RADA	3
3. SASTAV BAKTERIJSKOG BIOFILMA	4
4. FAZE U STVARANJU BIOFILMA	5
4.1. Početno reverzibilno pričvršćivanje	6
4.2. Ireverzibilno pričvršćivanje na podlogu	7
4.3. Razvoj mikrokolonija adheriranih mikroorganizama	8
4.4. Maturacija biofilma, izlučivanje EPS-a i razvoj 3D strukture	9
4.5. Disperzija biofilma	10
5. „QUORUM SENSING“ I NJEGOVA ULOGA U BAKTERIJSKOM BIOFILMU	12
6. KLINIČKI ZNAČAJ BIOFILMA	14
6.1. Tkivne infekcije	15
6.1.1. Cistična fibroza	15
6.1.2. Infekcije kroničnih rana	17
6.1.3. Infekcije usne šupljine.....	19
6.1.4. Endokarditis	20
6.1.5. Kronični osteomijelitis	21
6.2. Infekcije povezane s biomaterijalima	21
6.2.1. Ortopedski implantati	22
6.2.2. Urinarni kateteri	24

6.2.3.	Centralni venski kateteri.....	26
6.2.4.	Kontaktne leće.....	27
6.2.5.	Srčani implantati	28
6.2.6.	Intrauterini ulošci	29
7.	RASPRAVA.....	30
8.	ZAKLJUČCI.....	31
9.	SAŽETAK.....	32
10.	SUMMARY.....	33
11.	LITERATURA.....	34
12.	ŽIVOTOPIS.....	37

POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA

CF – cistična fibroza

EPS (eng. extracellular polymeric substances) – izvanstanične polimerne tvari

QS (eng. quorum sensing) – detekcija kvoruma

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

RNK - ribonukleinska kiselina

TFP (eng. type IV pili) – pili tipa IV

flaA – flagelin A

PIA (eng. polysaccharide intercellular adhesin) – polisaharidni međustanični adhezin

LTA (eng. lipoteichoic acid) – lipoteihoična kiselina

MSCRAMM (eng. microbial surface components recognising adhesive matrix molecules) – površinske mikrobne komponente koje prepoznaju adhezivne molekule matriksa

GMP (eng. guanosine monophosphate) - gvanozin monofosfat

ATP - adenzin trifosfat

ABC transporter (eng. ATP-binding cassette) – ATP-vezujući kasetni transporter

BAI (eng. biofilm-associated infections) – infekcije povezane s biofilmom

IE – infektivni endokarditis

KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest

CFTR (eng. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) – transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu

MIC (eng. minimum inhibitory concentration) - minimalna inhibitorna koncentracija

MBC (eng. minimum bactericidal concentration) – minimalna baktericidna koncentracija

SEM (eng. scanning electron microscopy) – skenirajuća elektronska mikroskopija

PJI (eng. prosthetic joint infection) – infekcija zglobne proteze

CAUTI (eng. catheter-associated urinary tract infections) – infekcije urinarnog trakta povezane s kateterima

CVC (eng. central venous catheter – centralni venski kateter

MK – mikrobni keratitis

ConS – koagulaza-negativni stafilokoki

IUD (eng. intrauterine device) – intrauterini uložak

NET (eng. neutrophil extracellular traps) – neutrofilne izvanstanične zamke

1. UVOD

Postojanje mikroorganizama tj. živih bića nevidljivih golom oku oduvijek je bio intrigantan koncept u povijesti čovječanstva, popularan i u znanstvenim i u religijskim zajednicama. Prvi čvrsti dokaz za postojanje mikroorganizama svijetu je predstavio nizozemski znanstvenik Antonie van Leeuwenhoek 1663. godine. Van Leeuwenhoek je razvio niz leća kroz koje je mogao uočiti prisutnost mikroorganizama. Zubni plak bio je jedan od prvih uzoraka koje je promatrao, uočivši u njemu prisutnost bakterija koje je tada nazvao *animalcules* tj. „životinjice“. Proveo je niz istraživanja na zubnom plaku i prvi je uočio fenomen otpornosti mikroorganizama koji žive u nakupinama, agregatima. Temeljem tih studija, zaključio je da je liječenje zubnog plaka grgljanjem octa uspjelo ubiti samo one bakterije koje se nalaze na vanjskoj strani plaka jer ocat nije mogao prodrijeti u unutrašnjost plaka. Time je ukazao na mogućnost postojanja organizirane zajednice mikroorganizama koja se u modernoj znanosti naziva biofilm. Van Leeuwenhoek-ova opažanja stvorila su temelj moderne mikrobiologije (1).

Postojanje zajednica mikroorganizama kasnije je potvrđeno od strane mnogih istraživača. U 1930-ima, biolozi mora otkrili su da je sluzavi sloj na površinama potopljenih brodova zapravo nakupina morskih bakterija i mikroalgi. U 1970-ima Niels Høiby primijetio je da je u oboljelih od cistične fibroze (CF) perzistentna pseudomonasna infekcija povezana sa sposobnošću stvaranja mukoidnih zajednica u plućnom tkivu pacijenata. Međutim, koncept biofilma kao glavni način života bakterija populariziran je zahvaljujući radu Williama Costertona. Prije njegovih otkrića smatralo se da bakterije žive u suspenziji kao slobodno plivajući organizmi što se naziva planktonski način života, ali kao rezultat njegovih istraživanja prirodne populacije bakterija na sluzavim površinama planinskih potoka, postalo je očito da je biofilm ili „život u zajednici“ preferiran način života mikroorganizama u prirodi. Costeron i njegov tim su primijetili da sluz sadržava bakterije obložene opsežnim fibrozim matriksom koji potiče razvoj mikrokolonija i pričvršćivanje na površinu te predstavlja funkcionalnu

zajednicu (1). Ponudili su do tada najbolju definiciju biofilma kojeg opisuju kao sesilnu zajednicu mikroorganizama koja se sastoji od stanica koje su međusobno ili za supstrat vezane ireverzibilno, a uložene su u izvanstanični matriks sastavljen od polimera koje su same proizvele i izražavaju izmijenjeni fenotip obzirom na brzinu rasta i transkripciju gena (2).

Mikroorganizmi mogu tvoriti biofilm na biotičkim i abiotičkim površinama, a mogu ga stvarati i bakterije i gljive. Kasnije je utvrđeno da je stvaranje biofilma složen proces reguliran kombinacijom mnogih varijabli u prirodi, što ovisi o mediju u kojem nastaje, supstratu i karakteristikama mikroorganizama. 1990-ih razumijevanje funkcioniranja biofilmova postaje detaljnije – dobro formiran biofilm se sastoji od mikroorganizama i izvanstaničnih polimernih tvari (EPS – extracellular polymeric substances) što predstavlja idealni okoliš za izmjenu genetičkog materijala između stanica. Otkriveno je i da mikrobne stanice unutar biofilma luče kemijske tvari za međusobnu komunikaciju potrebnu za izmjenu tekućina, pribavljanje nutrijenata, prijenos genetskog materijala, sintezu sekundarnih metabolita, i drugo. Ovakav komunikacijski sustav naziva se detekcija kvoruma ili „quorum sensing“ (QS) (3).

Danas je, u biomedicini, prihvaćena činjenica da je razumijevanje biofilmova od iznimne važnosti jer je 65-80% infektivnih bolesti povezano s njima. Osim toga, mikroorganizmi koji rastu u biofilmu pokazuju višu razinu rezistencije na lijekove što dovodi do kliničkog neuspjeha terapije. Mikroorganizmi u biofilmu su zaštićeni od antibiotika, antivirusnih, antimalaričnih, antifungalnih i anthelmintičkih lijekova, kao i dezificijensa te okolišnih stresnih utjecaja. Biofilm igra važnu ulogu u infekcijama povezanim s kirurškim implantatima i kateterima te nizom drugih bolesti. Stoga, proučavanje biofilmova ima značajnu ulogu u biomedicini, ali i u biotehnologiji, industriji, ekologiji i drugim raznolikim znanstvenim područjima (1,3).

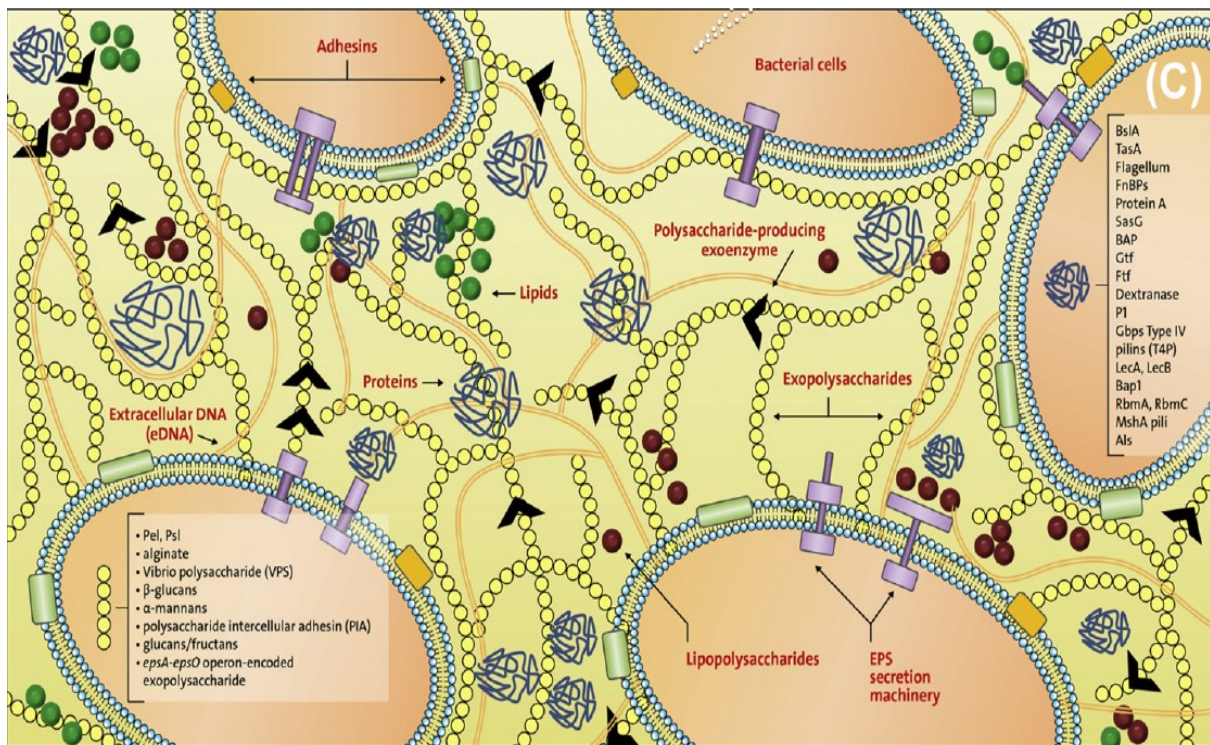
2. SVRHA RADA

Svrha ovog rada je opisati biofilm kao jedan od oblika života mikroorganizama u prirodi, njegovu građu i funkciju te dati sustavan pregled najčešćih infekcija povezanih s biofilmom u ljudi. Biofilm je opisan iz mikrobiološke perspektive, a infekcije su povezane s kliničkom praksom kako bi ovaj literaturni pregled ukratko zaokružio trenutna znanja i shvaćanja tog posebnog oblika bakterijskog suživota i njegovog značaja u medicini.

3. SASTAV BAKTERIJSKOG BIOFILMA

Bakterijski biofilm se sastoji od nakupine sesilnih bakterijskih stanica koje žive uklopljene u EPS koji osigurava fizičku zaštitu te pridonosi ireverzibilnom vezanju mikroorganizama za žive i nežive površine. EPS je neophodan za interakciju bakterija s vanjskim okruženjem i igra ključnu ulogu u stvaranju biofilma. Debljina EPS-a se kreće od 0.2 do 10 μm , a ukupna veličina biofilma ne prelazi više od 10 mm. Sesilne zajednice bakterija obuhvaćaju samo 5.35% njegovog ukupnog volumena, dok preostali volumen čini EPS. Ako se biofilmovi metaforički mogu nazvati “mikrobni gradovi”, EPS predstavlja “jednu od gradskih zgrada u kojoj žive mikrobne stanice”. EPS određuje neposredne uvjete života unutar biofilma utječući na njegovu poroznost, gustoću, sadržaj vode, naboj, hidrofobnost i mehaničku stabilnost. Glavne komponente EPS-a su polisaharidi i proteini koji stvaraju osnovni strukturni okvir matriksa. Uz njih, prisutne su i izvanstanična DNK (eDNK) i RNK (eRNK) (3). Sastav i struktura EPS-a može uvelike varirati ovisno o vrsti mikroorganizama, dostupnosti hranjivih tvari i okolišnim faktorima. Glavne biomolekule koje grade EPS se mogu podijeliti u dvije kategorije: molekule povezane sa staničnom površinom i one izlučene vanstanično. Primjere za prvu kategoriju čine nastavci bakterijskih stanica, bičevi i pili, uloženi u izvanstanični matriks. Funkcionalni amiloidi su visoko organizirane preteinske fibrile koje predstavljaju posebnu klasu EPS molekula. Poznato je da, u biofilmu, funkcionalni amiloidi moduliraju bakterijsku adeheziju, osiguravaju mehaničku stabilnost i čvrstoću. Ove jedinstvene molekularne strukture prepoznaje imunološki sustav potičući autoimuni odgovor. Vanstanično izlučene molekule su bakterijski egzopolisaharidi, proteini, eDNK i eRNK. Biomolekule podrijetlom od domaćina ili okoliša su također uključene u strukturu matriksa. Proteini i glikoproteini domaćina, kao što su primjerice oni iz sline, pridonose čvrstoći biofilma, pomažu u pričvršćivanju bakterija te služe kao izvor hranjivih tvari. Prisutnost minerala u biofilmu je rezultat procesa biomineralizacije koji je strogo reguliran djelovanjem okoliša i samih bakterija. Istraživanja su dokazala

prisutnost kalcijevog karbonata (CaCO_3) u matriksu biofilma bakterije *Bacillus subtilis* i *Mycobacterium smegmatis*. Mineral kalcit povezuje se s biofilmovima bakterija *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri* i *Pseudomonas aeruginosa*. Oni uzrokuju opsežnu enkrustaciju katetera mineralima kalcija i magnezija (4).

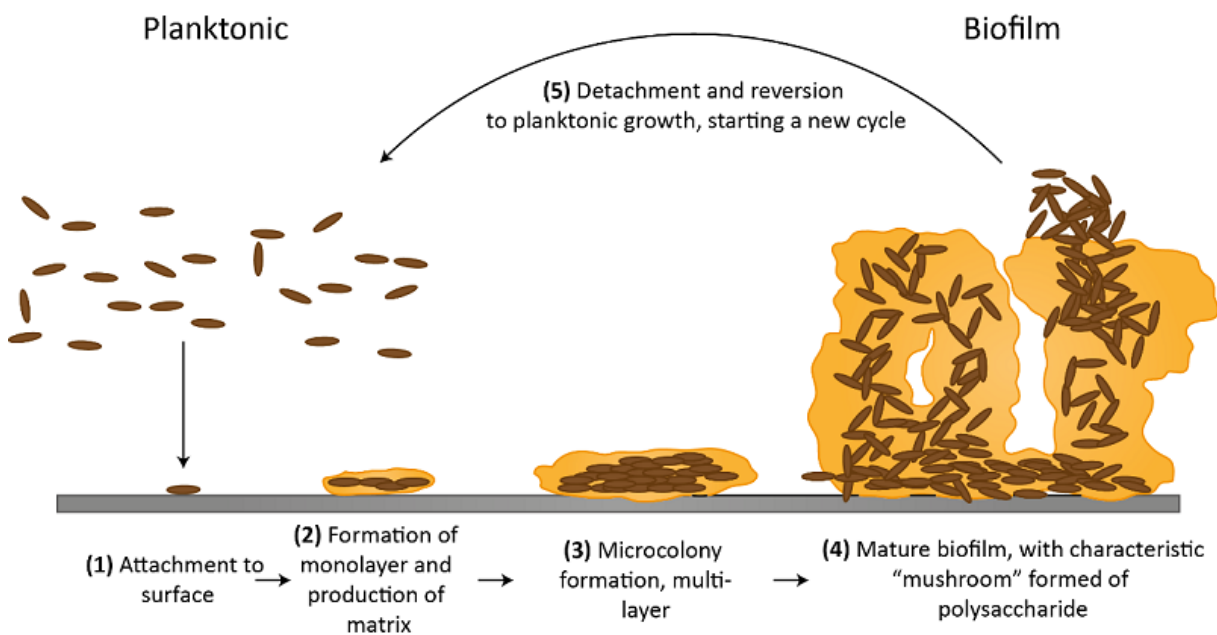


Slika 1: Građa tipičnog bakterijskog biofilma (Preuzeto iz reference 4.)

4. FAZE U STVARANJU BIOFILMA

Proces formiranja biofilma je složen, ali može se općenito podijeliti u nestabilnu fazu površinske adhezije nakon koje slijedi postojana faza gomilanja u kojoj se bakterije koagregiraju kako bi formirale zreli biofilm. Tijekom ovog evolutivnog procesa razvoja biofilma, mikroorganizmi prolaze kroz promjenu genske ekspresije ovisno o različitim razvojnim fazama (5). Samo površinski kontakt mikroorganizama ili njihovo taloženje na podlogu ne moraju nužno dovesti do stvaranja biofilma. Kao što je prikazano na Slici 2., razvoj biofilma na bilo kojoj površini uključuje dobro organiziran niz od pet uzastopnih događaja: 1.

Početno reverzibilno pričvršćivanje planktonskih mikroorganizama na podlogu, 2. Ireverzibilno pričvršćivanje organizama na podlogu, 3. Razvoj mikrokolonija adheriranih mikroorganizama, 4. Izlučivanje EPS-a i razvoj trodimenzionalne zrele zajednice, 5. Disperzija mikroorganizama iz zajednice u potrazi za novim površinama. Ove razvojne faze zajedničke su i bakterijskim i gljivičnim biofilmovima (1).



Slika 2: Faze u stvaranju biofilma (Preuzeto s: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/pathogens-disease/biofilms-and-their-role-pathogenesis>)

4.1. Početno reverzibilno pričvršćivanje

Uspješan početak stvaranja biofilma ovisi o čvrstom vezanju mikroorganizama za površinu. Predložene su brojne teorije koje to opisuju, međutim adhezija je složen proces određen svojstvima mikroorganizma, površinom pričvršćivanja i neposrednom okolinom. Stoga ovaj proces još uvijek nije potpuno razjašnjen. Ključno pitanje je koji okidač tjera bakteriju da prijanja za određenu površinu i napusti planktonski način života (1). Primjerice, u

gram-pozitivne bakterije *Bacillus subtilis*, globalni regulator transkripcije *sinR* potiskuje gene odgovorne za proizvodnju matriksa u pokretnim stanicama. Supresija dovodi do poboljšanog odvajanja stanica i povećane pokretljivosti. S druge strane, u uvjetima formiranja biofilma *B. subtilis* formira duge lance nepokretnih stanica koji rastu paralelno. *SinI*, *YibF*, i *YmcA* su antagonisti *sinR* regulatora transkripcije koji pomažu u gubitku pokretljivosti i formiranju staničnih lanaca te potiču proizvodnju matriksa (5).

Nisu sve bakterije sklone prijanjanju za površinu. Mikroorganizmi mogu doći u kontakt s određenom površinom putem Brownovog gibanja, sedimentacije, kretanja s protokom tekućine, bakterijske pokretljivosti koju omogućuju nastavci na površini bakterijske stanice ili putujući s drugim stanicama. Površinski nastavci kao što su pili tipa IV („Type IV pili“ – TFP) omogućuju detekciju vrste površine za koju će se bakterija adherirati te joj omogućuju prijelaz iz okomite u horizontalnu orijentaciju što je preduvjet za prijanjanje. Međudjelovanja koja se javljaju kao rezultat tih procesa određuju tijek vezivanja mikroorganizama za površinu. Nakon što se pričvrste na površinu, TFP pomažu mikroorganizmima da „puze“ kada je površina orijentirana paralelno sa stanicom i „hodaju“ kada je stanica u uspravnom položaju. Međutim, adhezija posredovana pilima tipa IV je nespecifična, budući da omogućuje bakteriji da prijanja na gotovo sve poznate abiotičke i biotičke površine. Kada bakterija dođe na kritičnu udaljenost koja iznosi 1 nm od podloge, zbroj privlačnih i odbojnih sila određuje hoće li doći do prijanjanja ili ne. To uključuje elektrostatske i hidrofobne interakcije, steričke utjecaje, van der Waalove sile, temperaturne i hidrodinamičke sile (1). Površine koje su hidrofobnije, poput teflona ili plastike, bolje reagiraju na mikrobnu kolonizaciju u usporedbi sa staklenim i metalnim površinama koje su po prirodi hidrofilne (5).

4.2. Ireverzibilno pričvršćivanje na podlogu

Druga faza bakterijske adhezije je ireverzibilna faza pričvršćivanja ili "zaključavanje" mikroorganizma za podlogu. Bakterijski površinski adhezini i stanični nastavci kao što su pili

glavni su u ovoj fazi prijanjanja. Osim toga, receptor-specifični ligandi koji se nalaze na pilima i fimbrijama mogu vezati mikroorganizme za površinu, posebno u slučaju biotičkih površina (1). Primjerice kod bakterije *E. coli* interakcije s površinom su posredovane pomoću tri vrste fimbrija: fimbrije tipa 1, „curli proteini“ i konjugacijski pili. Brojni receptori domaćina prepoznaju i vežu se za pile tipa 1 kao što je FimH receptor koji posjeduje dvije adhezivne domene na N i C terminalnom dijelu. Vrh N-terminalne domene sadrži mjesto vezanja ugljikohidrata koje ima ključnu ulogu u površinskom prepoznavanju. „Curli proteini“ potiču prijanjanje vezanjem na nekoliko eukariotskih proteina domaćina kao što su fibronektin, laminin i plazminogen (5).

Mikroorganizmi u biofilmu uglavnom ne pripadaju nekoj pojedinačnoj vrsti već postoje kao mješavina više vrsta. Tada dolazi do kompeticije ili sinergizma unutar zajednice mikroorganizama. Primjerice, neke bakterije se lijepe jedne za druge tvoreći bakterijske nakupine na površini. *Fusobacterium nucleatum*, bakterija pronađena u biofilmu zubnog plaka, sadrži višestruka vezna mjesta za razne druge bakterije te tako posreduje u koagregaciji s raznolikim oralnim bakterijama kao i proteinima iz sline (1).

Karakteristike površine za pričvršćivanje također imaju važnu ulogu u procesu prijanjanja. Neka od važnih površinskih svojstava uključuju površinski naboj, površinsku slobodnu energiju, hrapavost, hidrofobnost, topografiju konfiguracije i krutost. Primjerice, hidrofobnost može ili pospješiti ili inhibirati bakterijsku adheziju. U usnoj šupljini, posebno u supragingivalnoj regiji, manje se biofilma stvara na hidrofobnim površinama nego na hidrofilnim, dok se takva razlika ne opaža u subgingivalnom biofilmu (1).

4.3. Razvoj mikrokolonija adheriranih mikroorganizama

Nakon što se mikroorganizmi ireverzibilno povežu s površinom, sljedeći korak u razvoju biofilma je rast zajednice, međustanična komunikacija i umrežavanje mikroorganizama što u konačnici dovodi do dobro organizirane, trodimenzionalne strukture biofilma. Sinteza

bičeva u pokretnih bakterija se potiskuje kako bi se zadržale na mjestu pričvršćivanja. Mutacije u strukturnom genu biča, flagelinu A (flaA), rezultiraju povećanom proizvodnjom egzopolisaharida što sugerira da nedostatak biča vjerojatno služi kao signal za stvaranje biofilma. Također, komponente staničnog zida se mijenjaju i postaju ključne u sljedećim razvojnim koracima biofilma. Bakterije roda *Staphylococcus* posjeduju egzopolisaharid staničnog zida nazvan polisaharidni međustanični adheziv (polysaccharide intercellular adhesin – PIA). Važnost PIA za stvaranje biofilma dokazana je u brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama. Lipoteihoična kiselina (Lipoteichoic acid – LTA), komponenta stanične stijenke Gram-pozitivnih bakterija, pokazala se važnom za stvaranje biofilma vjerojatno zbog svoje interakcije s drugim površinskim polimerima putem elektrostatskih sila. Kod više vrsta gram-negativnih bakterija pričvršćivanje je pojačano specifičnim adhezivima koji se nalaze na površini bakterijske stanice ili na staničnim izdancima kao što su pili i flagele. Kod bakterija roda *Staphylococcus* postoji velika raznolikost površinski-usidrenih proteina obuhvaćenih zajedničkim akronimom MSCRAMM („microbial surface components recognising adhesive matrix molecules“) koji se vežu za proteine domaćina kao primjerice fibronektin. eDNK koju izlučuju bakterije također je važna jer daje negativan naboj za interakciju s pozitivno nabijenim površinskim molekulama (1).

4.4. Maturacija biofilma, izlučivanje EPS-a i razvoj 3D strukture

Sljedeći proces u formiranju biofilma je stvaranje prostorno organizirane trodimenzionalne zajednice. Iako granica između mladog i zrelog biofilma nije uvijek jasna, određene značajke kao što je stvaranje izvanstaničnog matriksa pomažu u njihovom razlikovanju. EPS pruža bakterijskoj zajednici zaštitu od utjecaja lijekova i drugih štetnih tvari, olakšava prianjanje za površine i stvaranje višeslojnog biofilma. Prisutnost EPS-a označava zrelu arhitekturu biofilma, ali krajnji oblik zrelog biofilma je određen različitim čimbenicima okoliša, posebno protoku tekućine u neposrednoj blizini. Brzina protoka tekućine izravno utječe

na morfologiju zrelog biofilma, pa je uočeno da bakterije kao što su *P. aeruginosa* i *V. cholerae* generiraju arhitektonski složene biofilmove nalik gljivama. Ove strukture karakterizira donekle sferični „klobuk“ na vrhu uže baze, koja se često naziva stapkom. Zreli biofilmovi imaju nekoliko slojeva mikrobnih stanica ugrađenih unutar matriksa, a sastoje se od heterogenih staničnih populacija s različitim razinama metaboličkih aktivnosti. Ova gradacija metaboličkih aktivnosti opažena je primjerice u biofilmovima koje stvaraju gljive iz roda *Candida* i *P. aeruginosa*. Unutar višeslojne strukture biofilma, donji slojevi su obično u stanju mirovanja, dok srednji i gornji slojevi pokazuju više razine metaboličkih aktivnosti. Kako sazrijevanje biofilma napreduje, dolazi do mirovanja određenih staničnih populacija zajedno s popratnim smanjenjem metaboličke aktivnosti i stanične održivosti. Ove subpopulacije stanica nazivaju se "perzisterima" i uočene su u bakterijskim biofilmovima koje formiraju npr. *P. aeruginosa*, *E. coli* i *S. aureus* te *C. albicans*. Stanice „perzisteri“ pokazuju znatno više razine otpornosti na antibiotike od ostalih stanica u biofilmu (1).

4.5. Disperzija biofilma

Završna faza u životnom ciklusu biofilma naziva se stadij raspršivanja ili disperzije i uključuje odvajanje stanica od zrelih biofilmova nakon čega slijedi kolonizacija novih površina. Odvajanje je pasivan proces uzrokovan silama napreznja. Prema nekim istraživanjima, odvajanje se događa samo u biofilmovima koji rastu pod laminarnim silama napreznja koje odjednom postanu turbulentnije. Disperzija je, s druge strane, aktivan proces koji obično pokreće nekoliko okolišnih čimbenika i QS mehanizmi. Potrebna je za širenje mikrobnih zajednica i ima važne kliničke posljedice u kontekstu *in vivo* infekcija povezanih s biofilmom. Odvojene stanice iz biofilma obično uspostavljaju sekundarne, ponekad i teže infekcije na drugim mjestima u tijelu domaćina, gdje također formiraju biofilm. Primjer za to je endokarditis. Osim toga, odvojene stanice također mogu uzrokovati akutne infekcije koje nisu direktno povezane s biofilmovima (1).

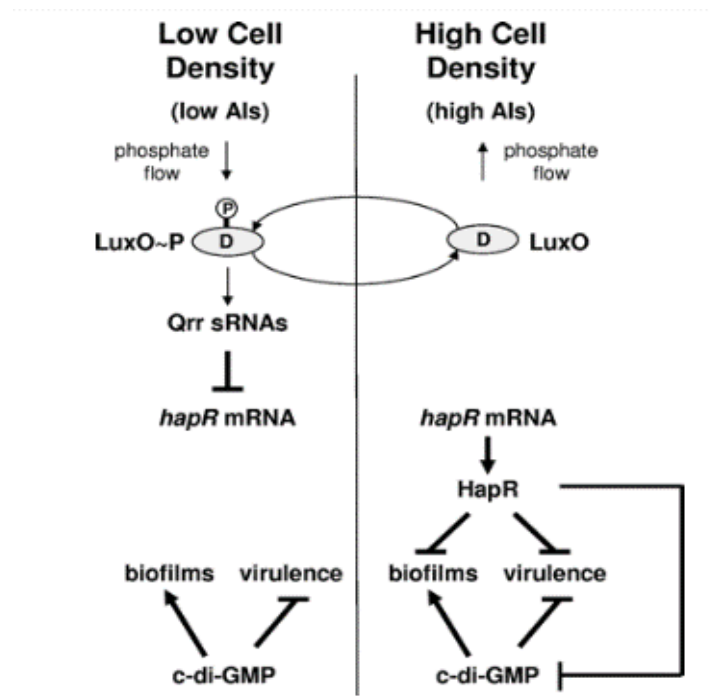
Disperzija je najmanje shvaćen i možda najsloženiji proces u razvoju bakterijskog i gljivičnog biofilma. Okidač za početak i biološki putevi koji moduliraju ovaj proces mogu se značajno razlikovati među različitim mikroorganizmima. Kod *P. aeruginosa* i *C. albicans* bakterijski sekundarni glasnici kao što je ciklički di-GMP daju kritične signale za stvaranje biofilma, kao i za raspršivanje. Ostali čimbenici koji signaliziraju disperziju mogu biti podražaji iz okoliša, hranjive tvari, kemijske tvari poput cis-2-decenske kiseline ili dušikovog oksida, proteini poput regulatora kemotaksije BdlA. Također je nedavno pokazano da status fosforilacije digvanilat-ciklaze NleD može utjecati na raspršivanje pseudomonasnih biofilmova. Stoga, važno je razumjeti procese disperzije biofilma kako bi se mogle razviti alternativne terapijske strategije (1).

Stanice koje disperzijom napuste zajednicu biofilma suočavaju se s gubitkom višestrukih prednosti koje su imale u biofilmu, uključujući i rezistenciju na lijekove. Postavlja se pitanje koji je onda razlog disperzije? Odgovor vjerojatno leži u činjenici da život u biofilmu ima i nekih nedostataka. Bakterije koje se nalaze na različitim lokacijama unutar biofilma imaju pristup različitoj koncentraciji hranjivih tvari i kisika, ali i otpadnih tvari poput kiselina nastalih fermentacijom u zonama osiromašenim kisikom. Kako biofilm raste, kemijski gradijenti hranjivih tvari i otpadnih produkata postaju strmiji, što rezultira povećanim neujednačenim pristupom resursima i dovodi do stvaranja subpopulacija. Osim toga, kontinuirani rast biofilma korelira s povećanom gustoćom stanica koja dodatno pogoršava kemijske gradijente i dovodi do natjecanja za nutrijentima. Stoga nije iznenađujuće da je stvaranje kemijskih gradijenata unutar biofilmova predloženo kao pokretačka snaga disperzije (7).

5. „QUORUM SENSING“ I NJEGOVA ULOGA U BAKTERIJSKOM BIOFILMU

Detekcija kvoruma, „Quorum sensing“ (QS) je regulatorni mehanizam bakterija koji uključuje otpuštanje kemijskih tvari koje aktiviraju ekspresiju bakterijskih gena koji kontroliraju specifične radnje skupine bakterija (8). Bakterijska komunikacija oslanja se na svestrane kemijske signalne molekule koje se nazivaju autoinduktori. Kao i jezici između ljudi, ti se signali razlikuju među vrstama bakterija. Neke bakterijske vrste mogu protumačiti mnogo različitih signala, dok druge reagiraju na nekoliko odabranih. QS omogućuje pojedinačnim bakterijama unutar kolonija koordinaciju i provođenje funkcija na razini cijele zajednice kao što su: sporulacija, bioluminiscencija, virulencija, konjugacija, kompetencija i stvaranje biofilma. Tijekom svog reproduktivnog ciklusa pojedine bakterijske stanice sintetiziraju različite autoinduktore. Gram-negativne bakterije proizvode acil-homoserin laktonske autoinduktore koji pasivno difundiraju kroz njihovu tanku staničnu stijenku. Nasuprot tome, gram-pozitivni bakterijski autoinduktori sastoje se od peptida i moraju se aktivno transportirati kroz njihovu peptidoglikansku staničnu stijenku pomoću ABC prijenosnog sustava („ATP-binding cassette“). Budući da se bakterije razmnožavaju, sve je više pojedinačnih stanica koje proizvode autoinduktore, a izvanstanična koncentracija autoinduktora raste sve dok ne dosegne kritičnu količinu. Ta količina čini prag nakon kojega je energetski nepovoljno da unutarstanični autoinduktore nastave napuštati stanicu (bilo putem difuzije ili transporta), što rezultira povećanjem njihove unutarstanične koncentracije. Povećanje intracelularne koncentracije dovodi do vezivanja autoinduktora za svoje receptore što pokreće signalne kaskade koje mijenjaju aktivnost faktora transkripcije i posljedično ekspresiju gena. Kod mnogih bakterija, promjena ekspresije gena uzrokuje smanjenje sinteze autoinduktora putem negativne povratne sprege (9,3).

Proces QS-a je dobro objašnjen na primjeru gram-negativne bakterije *Vibrio cholerae* (Slika 3). Stvaranje biofilma *V. cholerae* počinje odmah nakon ulaska u tanko crijevo osobe. Pojedinačni vibrioni proizvode autoinduktore specifične za vrstu tijekom reprodukcije i reguliraju svoj odgovor na autoinduktore preko globalnog regulatora LuxO. Kada je unutarstanična koncentracija autoinduktora niska, receptori autoinduktora djeluju kao kinaze, prenoseći fosfat u LuxO (LuxO~P). LuxO~P potiče ekspresiju proteina koji se koriste za izgradnju biofilma. Kako se *V. cholerae* razmnožava, izvanstanična koncentracija autoinduktora raste i na kraju premašuje unutarstaničnu koncentraciju. Intracelularna koncentracija autoinduktora zauzvrat raste, autoinduktori se vežu za svoje receptore i mijenjaju aktivnost receptora iz kinaze u fosfatazu. Receptori potom defosforiliraju LuxO, što dovodi do gašenja ekspresije gena specifičnog za biofilm (9).



Slika 3: „Quorum sensing“ mehanizam na primjeru bakterije *V. cholerae* (Preuzeto s:

<https://asm.org/Articles/2020/June/How-Quorum-Sensing-Works>)

Razumijevanje procesa QS-a je važno jer predstavlja jednu od mogućih točaka terapijskog djelovanja. Neke studije su pokazale da preopterećenje *V. cholerae* vlastitim autoinduktorom može potpuno zaustaviti proces stvaranja biofilma i potencijalno odgoditi infektivni proces dovoljno da ga naš imunološki sustav nadvlada. Narušavanje bakterijske komunikacijske strukture je uzbudljiva inovacija i praktičan odgovor na nagli porast antimikrobne rezistencije (9).

6. KLINIČKI ZNAČAJ BIOFILMA

Dobro je utvrđena patogena uloga mikrobnih biofilmova formiranih na ljudskim tkivima, ali i medicinskim uređajima. Čak i u zdravih ljudi, površine ljudskog tijela kao što su koža, zubi, sluznica usne šupljine i crijeva sadrže milijune komenzalnih mikroorganizama koji uglavnom stvaraju biofilme. Međutim, pod određenim okolnostima, prekid skladnog odnosa između domaćina i mikroorganizama može dovesti do ozbiljnih infekcija. Otprilike dvije trećine bolničkih infekcija su povezane s biofilmom (BAI – „biofilm-associated infections“) (1).

BAI se općenito kategoriziraju kao tkivne infekcije i infekcije povezane s biomaterijalima ovisno o tome stvaraju li se na biotičkim ili abiotičkim površinama. Primarna razlika između dva tipa infekcija je u tome što infekcije povezane s tkivnim biofilmom ne uključuju površinu stranog tijela. U nekim slučajevima pacijenti mogu imati obje vrste infekcija koje su međusobno u uzročno-posljedičnom odnosu. Uobičajeni primjeri su BAI u usnoj šupljini (uzrokovane supra i subgingivalnim plakom), gastrointestinalnom traktu, sluznici vagine i na koži. Kronične rane i respiratorne infekcije u bolesnika s CF-om također se smatraju tkivnim biofilmom. Biofilmovi na biomaterijalima mogu biti izgrađeni od gram-pozitivnih ili gram-negativnih bakterija ili kvasaca. Ti mikroorganizmi mogu potjecati s kože bolesnika ili zdravstvenih radnika te iz vode iz slavine kojoj su izloženi. Procjenjuje se da je učestalost BAI

vezanih uz biomaterijale, medicinske uređaje i implantate oko 2% za implantate dojke, 2% za zglobne proteze, 4% za mehaničke srčane zaliske, 10% za ventrikularne šantove, 4% za pacemakere i defibrilatore, a oko 40% za uređaje mehaničke cirkulatorne potpore (1,10).

6.1. Tkivne infekcije

Ljudsko tijelo sadrži otprilike 10 puta više mikroorganizama nego ljudskih stanica. Infekcije biofilma povezane s tkivom mogu se pojaviti kao rezultat oportunističkih infekcija poput oralne kandidijaze ili kao rezultat invazije patogenih organizama, kao u slučaju cistične fibroze (CF). Uglavnom se radi o kroničnim infekcijama koje su karakterizirane značajno povećanom rezistencijom uzročnika na antibiotike, velikom sposobnošću izbjegavanja imunološke obrane domaćina i upalnim odgovorom koji dodatno potiče oštećenje tkiva. Biofilm je glavni problem u infekcijama povezanim sa zdravstvenom skrbi koje povećavaju stope morbiditeta i mortaliteta pacijenata te generiraju visoke zdravstvene troškove. Liječenje tkivnih BAI može biti izazovno i razlikuje se ovisno o vrsti koloniziranog tkiva i težini infekcije. Za nekoliko infekcija se sa sigurnošću može reći da su rezultat stvaranja biofilma, a to su, među ostalima, infektivni endokarditis (IE), osteomijelitis, kronične rane koje ne zacjeljuju i infekcije pluća u pacijenata s CF ili kroničnom opstruktivnom plućnom bolešću (KOPB) (1, 11).

6.1.1. Cistična fibroza

Perzistentna plućna infekcija u bolesnika s CF-om klasičan je primjer tkivnih BAI. CF je autosomno recesivna bolest koja nastaje kao posljedica mutacije gena za transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ – CFTR). Ovaj defekt u genu mijenja konzistenciju mukoznih sekreta, što može rezultirati oslabljenom otpornošću na infekcije. Bakterijski biofilmovi prepoznati su kao čimbenici koji doprinose patogenezi i progresiji CF-a. *P. aeruginosa* i *Burkholderia cepacia* dvije su glavne gram-negativne bakterije koje inficiraju pluća pacijenata s CF-om, od kojih je

P. aeruginosa odgovoran za najveći morbiditet i mortalitet. Prisutnost biofilmova *P. aeruginosa* u donjim dišnim putovima dovodi do terapijskog neuspjeha i kronične upale, što posljedično dovodi do oštećenja pluća i smanjene funkcije pluća (1). *P. aeruginosa* proizvodi više različitih faktora koji su odgovorni za stvaranje bogatog EPS-a. Najpoznatiji je alginat kojeg producira kao odgovor na stres iz okoline, npr. nedostatak kisika koji je neophodan ovoj aerobnoj bakteriji. Tijekom kronične infekcije, *P. aeruginosa* mijenja fenotip i postaje mukoidan zbog prekomjerne proizvodnje egzopolisaharida alginata. Plućna infekcija mukoidnim sojevima pseudomonasa smatra se vodećim uzrokom smrtnosti među pacijentima oboljelim od CF-a. Alginat povećava otpornost i na imunološki sustav domaćina i na antibiotsku terapiju. Pri liječenju takvih infekcija, minimalna inhibitorna koncentracija („minimum inhibitory concentration“ – MIC) i minimalna baktericidna koncentracija („minimum bactericidal concentration“ – MBC) antibiotika mogu biti 100-1000 puta veće kod zrelih biofilmova, dok su mladi biofilmovi ipak nešto manje otporni. Glavni problem leži u činjenici da su antibiotici prisutni na tržištu razvijeni, a doze određene za mikroorganizme planktonskog tipa (3, 2).

Logična posljedica rezistentnih biofilmova je provođenje profilakse i rana agresivna terapija infekcije prije nego što se biofilm potpuno uspostavi i započne upalna reakcija koja dovodi do oštećenja tkiva i kliničkih simptoma. Preporučuje se primjena oralnog ciprofloksacina u kombinaciji s inhalacijom kolistina. Inhalacija tobramicina ili gentamicina također se pokazala učinkovitom. Ovaj rani, agresivni terapijski pristup široko je prihvaćen i često se koristi. Daljnju eskalaciju ovog pristupa moguće je postići dodavanjem makrolida ili N-acetilcisteina. Nedavno je ustanovljeno da je izvanstanična DNK prisutna u pseudomonasnim biofilmovima neophodna za rani i uspješni razvoj biofilma. Goveđa deoksiribonukleaza I uspješno razgrađuje ovu DNK i time može potpuno inhibirati uspostavu biofilma pa stoga profilaktička upotreba deoksiribonukleaze sprječava nastanak kronične plućne infekcije. Terapija održavanja obuhvaća intravenski tobramicin u kombinaciji s beta-

laktamskim antibiotikom. Odvija se u redovitim dvotjednim ciklusima intenzivnog intravenoznog liječenja svaka 3 mjeseca. Dodatno, terapijski protokol može uključivati i dnevne inhalacije kolistina između i tijekom ciklusa intravenskih antibiotika, a ponekad i davanjem oralnog ciprofloksacina između ovih ciklusa. Time se opetovano obnavlja plućna funkcija što je značajno poboljšalo preživljenje bolesnika s CF-om (12).

6.1.2. Infekcije kroničnih rana

Rana se smatra kroničnom kada pod utjecajem različitih unutarnjih ili vanjskih čimbenika ne može postići anatomske i funkcionalne integritet kroz uredne i pravovremene procese cijeljenja. U humanoj medicini, kronične rane uključuju rane koje nastaju najčešće na nogama kao komplikacija već postojećih vaskularnih, metaboličkih i neuropatskih bolesti. Kronična rana je zaustavljena u upalnoj fazi cijeljenja rane i ne može dalje napredovati. Dok je biofilm prisutan u svega oko 6% akutnih rana, preko 90% kroničnih rana sadrži bakterije i gljive uklopljene u biofilm. Polimikrobna priroda ovog patogenog biofilma ključna je za razumijevanje kroničnosti lezije. Među patogenima, *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa*, *Candida albicans* i β -hemolitički streptokoki primarni su uzroci infekcije i odgođenog zacjeljivanja rana. (3, 13). Osim navedenih, često su uključene i druge bakterijske vrste, npr. *Enterococcus faecalis*, anaerobne bakterije, *Proteus* spp., itd.

Trenutno ne postoje sigurne specifične kliničke manifestacije za prisutnost biofilma u rani, ali 2012. „Svjetski seminar o biofilmu“ je sažeo najvjerojatnije kliničke dijagnostičke kriterije: 1. blijedo i edematozno ležište rane, 2. krhko granulacijsko tkivo, 3. velika količina žutog eksudata, 4. nekrotično i truležno tkivo, 5. bol, 6. neugodan miris. Ovi su kriteriji ažurirani 2017., a od tada uključuju još i: 1. otpornost na liječenje antibioticima ili antisepticima, 2. neuspjeh liječenja unatoč korištenju odgovarajućih antibiotika ili antiseptika, 3. odgođeno zacjeljivanje, 4. ciklusi rekurentne infekcije ili pogoršanja, 5. prekomjerna vlažnost i eksudat iz rane, 6. kronična upala niskog stupnja, 7. eritem niskog stupnja. Nedavne

smjernice Europskog društva za kliničku mikrobiologiju govore da su uporaba skenirajuće elektronske mikroskopije („Scanning electron microscopy“ – SEM) i konfokalne laserske skenirajuće mikroskopije najpouzdanije vrste dijagnostičkih tehnika. SEM tehnika može identificirati biofilmove u ranama koje ne pokazuju nikakve znakove akutne infekcije. Međutim, ove tehnike snimanja su visoko specijalizirane i nisu praktične u rutinskom kliničkom radu (13). Tradicionalna mikrobiološka obrada uključuje kultivaciju uzoraka iz rane dobivenih brisom, iglenom aspiracijom ili biopsijom tkiva.

Liječenje obično započinje detaljnim debridmanom rane koji omogućava fizičko uništavanje strukture biofilma i pretvorbu bakterija iz sesilnog u planktonsko stanje koje je neophodno kako bi bile podložne antimikrobnom liječenju. Ako je bol ograničavajući čimbenik, treba razmotriti beskontaktne metode, poput ultrazvuka. Nakon debridmana slijedi lokalna antimikrobna terapija kako bi se spriječilo ponovno uspostavljanje biofilma. Apsorpcijske tvari impregnirane antibioticima učinkovita su topikalna antimikrobna terapija koja ponekad nije dovoljna, osobito u kontekstu podležućeg osteomijelitisa, pa treba uključiti i sustavnu antibiotsku terapiju. Antibiotici se biraju sukladno antibiogramu dobivenom iz uzorkovanog brisa ili tkiva uzetog biopsijom (1, 14).

Nove strategije liječenja infekcija kroničnih rana s prisutnim biofilmom mogu se grupirati u tri široke kategorije temeljem životnog ciklusa biofilma kojeg pogađaju. To su: 1. inhibitori adhezije bakterija, 2. inhibitori sazrijevanja biofilma i 3. promotori razgradnje biofilma. Testirano je nekoliko vrsta fizikalnih, kemijskih i bioloških sredstava u tu svrhu, međutim niti jedno od njih se službeno ne koristi prvenstveno zbog oskudnih kliničkih dokaza učinkovitosti.

6.1.3. Infekcije usne šupljine

Usna šupljina sadrži više od 700 različitih bakterijskih vrsta, a slina sadrži otprilike 10^8 - 10^9 bakterija po mililitru. Oralne bakterije prijanjaju za površinu zuba i stvaraju biofilm koji uzrokuje bolesti zuba i njihovih potpornih tkiva, što rezultira zubnim karijesom i bolestima periodonta. Zubni karijes se povezuje sa supragingivalnim biofilmom u kojem značajnu ulogu imaju *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* i *Lactobacillus acidophilus*, dok se anaerobne, parodontopatogene bakterije kao što su *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* i *Treponema denticola* povezuju sa subgingivalnim biofilmom i nastankom parodontopatija. Međutim, sastav zubnog biofilma razlikuje se, ne samo među različitim mjestima u usnoj šupljini, već i među pojedincima. Zubni biofilm dio je rezidentne oralne mikrobiote koja je uravnotežena i smatra se korisnom za domaćina. Međutim, ako je ta homeostaza narušena kao posljedica loše oralne higijene ili lijekova, može doći do promjena i prevage virulentnijih bakterijskih vrsta koje postaju dominantne što pogoduje razvoju bolesti zuba i parodonta (11). Oko 50% mikrobiote oralnog biofilma može se identificirati uporabom tradicionalnih mikrobioloških metoda. Ostalih 50% se dokazuje molekularnim postupcima neovisnima o kulturi.

Kontrola oralnih biofilmova pravilnom higijenom usne šupljine i redovitom njegom zuba ključna je za sprječavanje lokalnog ili sustavnog razvoja infekcije. Četkanje zuba, čišćenje između zuba i profesionalni postupci uklanjanja kamenca mehaničke su metode potrebne za redovito i učinkovito uklanjanje zubnog biofilma. Odgovarajuća uporaba fluorida, izbjegavanje česte konzumacije pića koja sadrže šećer i izbjegavanje noćnog hranjenja može pomoći u prevenciji razvoja infekcija povezanih s biofilmom usne šupljine kod djece. Kada se utvrdi prisutnost infekcije, potrebno ju je ukloniti endodontskim liječenjem ili kirurškim zahvatom (11, 15).

6.1.4. Endokarditis

Interakcija bakterija s endotelom srca dovodi do razvoja infektivnog endokarditisa (IE). Formirajući biofilm bakterije oštećuju srčane zaliske i dovode do gubitka njihove funkcije što rezultira stenozom ili insuficijencijom zalistaka. Prisutnost bakterija na zaliscima često za posljedicu ima trajne vrućice i druge komplikacije. U nekim slučajevima biofilm se može razbiti u nekoliko manjih dijelova koje krvožilni sustav prenosi dalje u različite dijelove tijela poput mozga ili bubrega (3). IE je povezan s visokim morbiditetom i mortalitetom, a u oko 80% slučajeva uzročnici su bakterije roda *Staphylococcus* i *Streptococcus*, dok se kao treći vodeći uzročnik, osobito u bolesnika starijih od 70 godina, navodi *Enterococcus* spp. Znatno rjeđe su vrste HACEK skupine (*Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* i *Kingella* spp.) identificirane kao četvrti najčešći uzročnik IE na nativnim srčanim zaliscima. S povijesnog gledišta, Costerton i sur. su 1999. godine prvi prepoznali IE kao infekciju povezanu s biofilmom uzrokovanu viridans streptokokima. Proces formiranja biofilma uključuje nekoliko koraka: prvo mora postojati oštećenje endotela zaliska, zatim se formira sterilna lezija građena od trombocita i fibrina. Nakon toga se bakterije prisutne u krvi tijekom epizode bakterijemije počinju lijepiti za tromb dok se ne formira zreli biofilm. Nekoliko adhezivnih molekula eksprimira se na staničnoj stijenci Gram-pozitivnih bakterija i olakšava prianjanje na endotelne stanice, trombocite i izvanstanični matriks, fibrinogen i kolagen. Za nekoliko biofilm-infekcija utvrđeno je da su kombinacije antibiotika bitne za optimalan ishod liječenja. Za IE na nativnim zaliscima, klinički povoljan ishod IE uspostavljen je dodavanjem aminoglikozida β -laktamskim antibioticima (ili glikopeptidima) u slučajevima kada je IE uzrokovan *E. faecalis* ili nekim streptokokima. Iako se bakterijemija može uspješno liječiti antimikrobnim lijekovima, perzisteri u dubljim slojevima biofilma mogu preživjeti unatoč višestrukim antibiotskim tretmanima i stoga je često potreban i kirurški pristup u liječenju IE (11).

6.1.5. Kronični osteomijelitis

Kronični osteomijelitis je infekcija kostiju koju je teško liječiti i povezana je s visokim morbiditetom i ekonomskim opterećenjem. Rezultat je endogenog (hematogeni osteomijelitis) ili egzogenog prijenosa bakterija. Hematogeni osteomijelitis je, u pravilu, monomikrobne etiologije, to jest, jedna vrsta bakterije izolirana je iz zahvaćene regije. Polimikrobni hematogeni osteomijelitis je rijedak. Stafilokoki su uzročnici u približno 75% slučajeva, pri čemu je *S. aureus* najčešći uzročnik, dok se anaerobi i Gram-negativni bacili, kao što je *Pseudomonas* spp. i *Enterobacterales*, češće pojavljuju kod polimikrobnog osteomijelitisa. Kronični osteomijelitis karakterizira opsežna devaskularizirana kost, upala niskog stupnja i prisutnost bakterijskog biofilma koji kolonizira kost, fibrozno tkivo i sinuse. Upravo se biofilm smatra jednim od vodećih uzroka neuspjeha u mikrobiološkoj eradikaciji. Nadalje, postojanost bakterija duboko u kosti odgovorna je za uočene visoke stope recidiva, čak i nakon dugog vremenskog razdoblja. To posebno vrijedi za stafilokokni biofilm koji može biti u stanju mirovanja nekoliko godina dok ne izazove infekciju (11). Infekcije biofilmom obično su podmukle u početku, otporne su na liječenje i mogu se pojaviti i kod imunokompetentnih pojedinaca. Poznato je da dolazi do kolonizacije biofilmom na mrtvim kostima, fibroziranim tkivima i sinusima u slučaju osteomijelitisa.

6.2. Infekcije povezane s biomaterijalima

BAI povezane s biomaterijalima nastaju kada mikroorganizmi adheriraju na ugrađeni uređaj i postoje povoljni uvjeti za razvoj biofilma. Ako se pravovremeno ne iskorijene, ovi biofilmovi mogu biti stalan izvor infekcije i neispravnosti uređaja što može izazvati teške posljedice za domaćina. Infekcije povezane s medicinskim uređajima teško je liječiti, a recidivi su česti. Zabilježeno je stvaranje biofilma na gotovo svim medicinskim uređajima koji se trenutno koriste – centralnim venskim kateterima, urinarnim kateterima, kateterima za peritonealnu dijalizu, protetskim srčanim zaliscima, srčanim stimulatorima, umjetnim

glasovnim protezama, zamjenskim zglobovima, ventrikularnim šantovima, endotrahealnim tubusima, kontaktnim lećama, čak i protetskim napravama za erektilnu disfunkciju. Stoga su medicinski uređaji odgovorni za velik broj nozokomijalnih infekcija, posebice kod kritično bolesnih pacijenata u jedinicama intenzivnog liječenja. Stvaranje biofilma na površini medicinskog proizvoda za višekratnu upotrebu slično je stvaranju biofilma na drugim površinama i kompleksni je proces koji počinje predkondicioniranjem i prelazi na početno reverzibilno, zatim ireverzibilno pričvršćivanje mikroorganizama, stvaranje mikrokolonija i konačno sazrijevanje biofilma. U prvoj fazi, temeljni sloj za predkondicioniranje organskog materijala iz tjelesnih tekućina u kontaktu s uređajem taloži se na njegovoj površini. Zatim, kolonizacijski mikroorganizmi nastavljaju s početnim pričvršćivanjem na predkondicioniranu površinu, no u toj fazi mogu se lako ukloniti čišćenjem. Ako se ne uklone mehničkim postupkom, počinje nepovratno pričvršćivanje, razmnožavanje mikroorganizama i stvaranje zrelog biofilma. Konačno, zreli biofilm povremeno će otpuštati nove kolonizirajuće stanice kako bi pokrenuo biofilmove na novim površinama. Svi ovi koraci ovise o nizu čimbenika, uključujući dostupnost hranjivih tvari, temperaturu, topografiju supstrata, miješanje, brzinu protoka tjelesne tekućine i veličinu inokuluma. Iako prevladavajuće vrste mikroorganizama na biofilmovima medicinskih uređaja mogu varirati ovisno o vrsti medicinskog uređaja, u pravilu ih u početku kolonizira jedna bakterijska vrsta. Kako razvoj biofilma napreduje, povećava se broj bakterijskih vrsta u zajednici. Biofilm na medicinskim uređajima mogu formirati i Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, a najzastupljenije su *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, viridans streptokoki, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* i *Pseudomonas aeruginosa* (1, 16) .

6.2.1. Ortopedski implantati

Ortopedski koštani implantati mogu oštetiti okolna tkiva prilikom ugradnje, stvarajući tako povoljne uvjete za stvaranje mikrobnog biofilma, a time i infekcije, osobito kada je

imunološki sustav domaćina ugrožen. Infekcije povezane s ortopedskim implantatima su brojne, imaju visoke stope morbiditeta i mortaliteta, uzrokuju teške komplikacije, a liječenje je skupo. Općenito, oko 5% ortopedskih implantata se inficira. Mogućnost infekcije koštanog implantata povećava se za 5-40% u slučaju reoperacije. To su u pravilu oportunističke infekcije i 16% ih je polimikrobno. *S. epidermidis* i *S. aureus* glavni su etiološki uzročnici ortopedskih infekcija (17).

Infekcije povezane s ortopedskim implantatima mogu se klasificirati ovisno o vremenu kada se javljaju nakon implantacije: 1. rane infekcije koje se javljaju do 3 mjeseca nakon operacije, a koje uzrokuju visoko virulentni mikroorganizmi (npr. *S. aureus*); 2. kasne infekcije koje se javljaju između 3. i 24. mjeseca od operacije uzrokovane mikroorganizmima sa smanjenom virulencijom (npr. koagulaza-negativni stafilokoki, *Cutibacterium acnes*); 3. sekundarne infekcije koje se javljaju 24 mjeseca nakon operacije i koje su komplikacije infekcija okolnih tkiva (primjerice u dišnom ili mokraćnom sustavu, na zubima ili koži). Infekcije povezane s ugradnjom proteze kuka zahtijevaju posebnu pozornost zbog teških komplikacija koje mogu uslijediti. Upotreba implantata za zamjenu kuka porasla je u posljednjem desetljeću kao uvjet za poboljšanje kvalitete života starijih osoba. Međutim, implantacija je također povezana s neželjenim učincima uzrokovanim formiranjem biofilma na površini proteze. Mikroorganizmi mogu potjecati od izravne kontaminacije proteze, od kontaminirane rane ili od infekcije susjednih tkiva. Bolesnici starije dobi i oni s drugim komorbiditetima (bolesti srca, dijabetes, karcinom, reumatoidni artritis itd.) imaju povećani rizik od stjecanja infekcija povezanih s ugradnjom proteze kuka. Zabilježena je učestalost infekcije od 9,5% u bolesnika starijih od 80 godina (17).

Jednom kada pacijent razvije infekciju ortopedske proteze koja se ne može riješiti antibiotskom terapijom, često je jedino održivo rješenje uklanjanje zahvaćenog implantata. Pokazalo se da je primjena antibiotika bez uklanjanja implantata uspješna samo u 22-37%

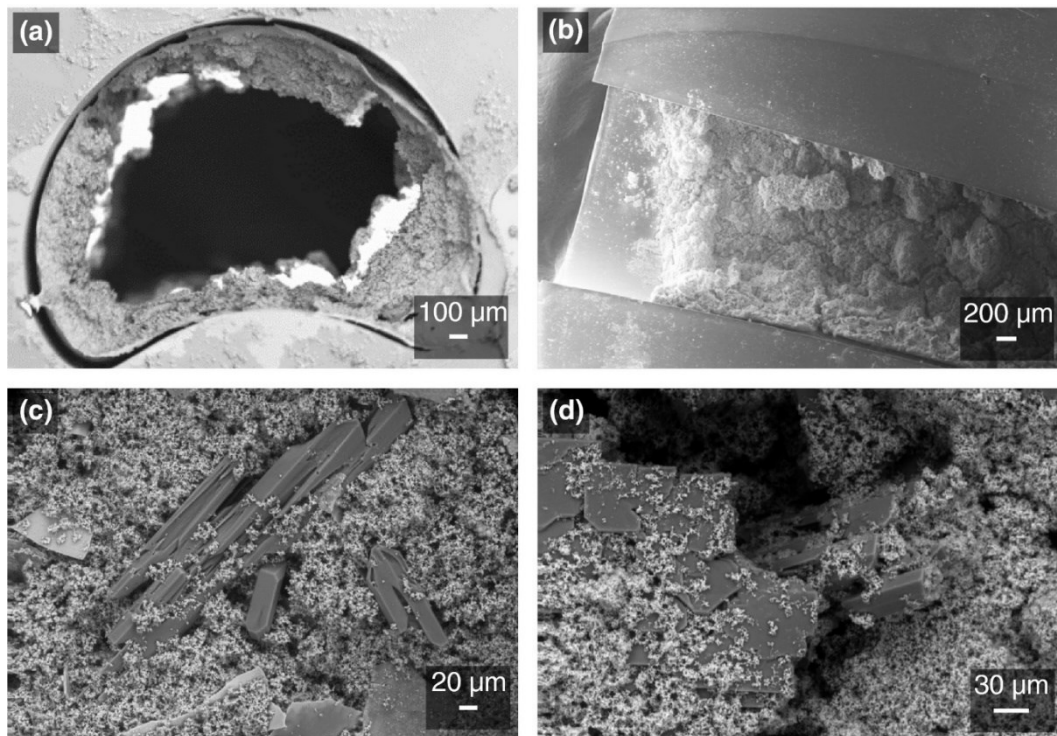
slučajeva. U slučajevima PJI („Prosthetic joint infection“ – Infekcija zglobne proteze), uklanjanje proteze se postiže na jedan od dva načina. U prvome se proteza uklanja i ugrađuje nova u jednoj operaciji. Ova tehnika zahtijeva da u okolnom tkivu nema infekcije niti sekundarnih oštećenja, da je mikroorganizam osjetljiv na antibiotike i da pacijent nema ozbiljne komorbiditete. Drugi način uklanjanja podrazumijeva dva operativna postupka kako bi se pokušalo osigurati da su svi patogeni uklonjeni prije ponovne implantacije zbog visokog rizika reinfekcije zaostalim mikroorganizmima. Razdoblje između operacija omogućuje antibiotsku terapiju i nadzor prije ugradnje nove proteze. Implantat se uklanja i obično se primjenjuju intravenski antibiotici tijekom 2-8 tjedana. Nakon završetka liječenja antibioticima, ugrađuje se nova proteza (18).

6.2.2. Urinarni kateteri

Foley kateteri su zaobljeni urinarni kateteri građeni od lateksa ili silikona koji se postavljaju kroz uretru kako bi se olakšala evakuacija urina iz mjehura (16). Oko 25% hospitaliziranih pacijenata treba određeno vrijeme urinarni kateter pa su infekcije povezane s njima izrazito česte. Trajanje kateterizacije je jedan od glavnih čimbenika rizika za razvoj biofilmova. Procjenjuje se da se rizik od dobivanja infekcije povećava za 5% svaki dan korištenja katetera tako da je ukupan rizik za pacijenta da razvije infekciju povezanu s kateterizacijom 35-39%. Ove infekcije su ujedno i primarni izvor sistemskih infekcija u nešto više od 8% slučajeva. Uzročnici infekcija mokraćnog sustava povezanih s kateterima mogu potjecati iz perinealne mikrobiote bolesnika ili s ruku medicinskog osoblja, a najzastupljeniji su *E. coli* i vrste iz rodova *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter* i *Candida* (17).

Posebni problemi proizlaze iz kolonizacije katetera ureaza-producirajućim vrstama bakterija kao što je *Proteus mirabilis*. One stvaraju neuobičajene kristalne biofilme koji prekrivaju površine katetera i blokiraju protok urina. Inkrustacija i blokada dovode do niza ozbiljnih kliničkih komplikacija kod dugotrajno kateteriziranih pacijenata. Blokada katetera

može rezultirati istjecanjem urina što uzrokuje inkontinenciju, ali često dovodi i do nakupljanja inficiranog urina u mokraćnom mjehuru i refluksa u gornji dio mokraćnog sustava i bubrege. Refluks inficiranog urina može izazvati ozbiljne posljedice kao što su pijelonefritis, sepsa i septički šok. Osim toga, budući da su kristalne naslage tvrde i abrazivne, nakupine koje se stvaraju na vrhu katetera i balonu mogu uzrokovati traumu sluznice mjehura i uretre pri uklanjanju katetera. Kombinacija snažne sposobnosti stvaranja biofilmova na površinama katetera i proizvodnje visoko aktivne ureaze ključni su čimbenici koji pokreću inkrustaciju (Slika 4). Urealitička aktivnost *P. mirabilis* dovodi do stvaranja amonijaka i povećanja pH urina. Pod tim alkalnim uvjetima normalno topivi sastojci urina talože se i počinju stvarati kristale fosfatnog minerala struvita i kalcijevog fosfata (hidroksiapatit). Ovi kristali postaju zarobljeni unutar razvijajućeg biofilma gdje se njihov rast stabilizira i pojačava što u konačnici rezultira stvaranjem mineralizirane strukture biofilma (19).



Slika 4: Kristalni biofilm bakterije *Proteus mirabilis* na silikonskom Foley kateteru – a) Lumen katetera snimljen skenirajućim elektronskim mikroskopom, b) Poprječni presjek lumena katetera, c) i d) Struvitni kristali unutar biofilma na većem povećanju (Preuzeto iz reference 19).

Strategije kontrole CAUTI („Catheter-associated Urinary Tract Infections“ – infekcije urinarnog trakta povezane s kateterima) uključuju modifikaciju površina katetera kako bi se spriječilo prianjanje mikroba ili pospješilo antimikrobno djelovanje, sprječavanje stvaranja kristala u biofilmu putem modifikacije prehrane ili pH mokraće i unaprjeđenje tehnika postavljanja katetera u zdravstvenim ustanovama (19). Kao dio terapije CAUTI preporuča se promjena urinarnog katetera te antimikrobno liječenje kroz pet do deset dana.

6.2.3. Centralni venski kateteri

Centralni venski kateter je posebna vrsta katetera koji se postavlja u venu širokog lumena kao što su unutarnja jugularna, subklavijalna, aksilarna ili femoralna vena. CVC („central venous catheter“ – centralni venski kateter) pruža alternativni način primjene lijekova

ili hranjivih tvari pacijentima koji ih ne mogu uzimati oralno. Kako se CVC obično koriste za kritično bolesne pacijente, može biti potrebno njihovo postavljanje na duže vremensko razdoblje. Zbog toga postaju sklони stvaranju biofilma, što na kraju dovodi do bakterijemije i sepsa. U tom slučaju, smrtnost iznosi 12-25%. Nakon insercije, površina katetera brzo se oblaže raznolikim proteinima dobivenim od domaćina kao što su fibrin, fibrinogen, fibronektin, kolagen, elastin i laminin, koji služe kao put za bakterije koje su prošle kožnu barijeru. Mikroorganizmi mogu započeti s kolonizacijom medicinskih uređaja, stvarajući biofilm, već 24 sata nakon postavljanja katetera. Najčešći mikroorganizmi koji se povezuju s CVC-infekcijama su *S. epidermidis*, *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* i *E. faecalis*. Oni se mogu unijeti egzogenim putem od samog pacijenta, zdravstvenih djelatnika ili bolničkog okruženja, ili endogeno putem hematogenog širenja s udaljenog mjesta infekcije (1). Mjere opreza koje se mogu poduzeti da do infekcije ne dođe uključuju rad u aseptičkom okruženju, upotreba katetera obloženih antibioticima kao što su minociklin i rifampicin te u novije vrijeme upotreba katetera napravljenih od slabije adhezivnih materijala. Liječenje se sastoji od uklanjanja katetera i sustavne primjene antibiotika (3).

6.2.4. Kontaktne leće

Kontaktne leće klasificiraju se u dvije kategorije - krute ili tvrde te novije razvijene meke leće. Dvije se vrste razlikuju po sastavu, relativnim prednostima i nedostacima koje nude i po svojoj osjetljivosti na infekcije i razvoj biofilma. Stvaranje biofilma na kontaktnim lećama i kutijama za čuvanje leća je faktor rizika za infekcije rožnice i okolnih struktura oka. Infekcije nastaju kada takve leće dođu u dodir s okom ili se stave u oko, a najčešće infekcije koje uzrokuju su mikrobní keratitis (MK), akutno crvenilo oka povezano s kontaktnim lećama, periferni ulkus rožnice i infiltrativni keratitis. MK može rezultirati gubitkom vida zbog razvitka ožiljka na rožnici. Otprilike 12%–66% svih slučajeva mikrobnog keratitisa dovodi se u vezu s nošenjem kontaktnih leća. Loše prilagođena ili potencijalno kontaminirana kontaktna leća može

promijeniti integritet epitela rožnice, dopuštajući lak pristup mogućim slobodnim mikroorganizmima iz biofilma da prodru u ugroženu rožnicu i izazovu infekciju. Nadalje, prisutnost kontaktne leće na oku može također negativno utjecati na antimikrobno djelovanje suza, uzrokujući povećanje bakterijskog opterećenja i naknadnu invaziju rožnice. Sprječavanje dugotrajne kontaminacije i kolonizacije kontaktnih leća i kutija za pohranjivanje pomaže u smanjenju učestalosti MK (20). Studije su dokazale da je trljanje leća u odgovarajućim otopinama jedan od najboljih načina za izbjegavanje infekcija oka jer se time uklanjaju proteini i druge sastavnice biofilma što olakšava otplavlivanje bakterija. Preporučuje se i mijenjanje kutije u kojoj se spremaju leće najmanje tri puta godišnje (21).

6.2.5. Srčani implantati

Kardiokirurški implantati kao što su protetski srčani zalisci, srčani stimulatori i srčani defibrilatori skloni su stvaranju biofilma koji može dovesti do endokarditisa. Nakon kirurške implantacije, cirkulirajući trombociti i proteini plazme stvaraju „kondicionirajući“ film na mehaničkim srčanim zaliscima koji sadrži vezna mjesta za cirkulirajuće mikroorganizme. Najčešći patogeni povezani s endokarditisom umjetnih srčanih zalistaka su *S. aureus* i koagulaza-negativni stafilokoki („Coagulase-Negative Staphylococci“ – ConS) kao što je *S. epidermidis* koji su dio normalne mikrobiote bolesnika. *Candida* također zna biti čest uzročnik. Budući da je endokarditis povezan s kontinuiranom bakterijemijom koja proizlazi iz svakodnevnih životnih aktivnosti, moguće je izolirati uzročnika rutinskim uzimanjem hemokulture. Međutim, rezultati hemokultura mogu biti negativni ako je pacijent nedavno primao antibiotike. Klinička praksa nalaže kiruršku zamjenu gotovo svih protetskih zalistaka kontaminiranih vrstama *S. aureus* ili *Candida*. Ponekad, kirurška intervencija možda neće biti potrebna kod pacijenata zaraženih koagulaza-negativnim stafilokokima ako dobro odgovaraju na antibiotsku terapiju. Bez obzira na uzročnika, srčane komplikacije kao što su kongestivno zatajenje srca, abnormalnosti provođenja impulsa, paravalvularni apscesi, dehiscencija zaliska

i teška periferna embolizacija svakako zahtijevaju kiruršku zamjenu inficiranog zaliska. Iako relativno rijedak, endokarditis protetske valvule je opasan po život, sa smrtnošću većom od 30% (1).

6.2.6. Intrauterini ulošci

U mnogim su zemljama intrauterini ulošci (IUD – „intrauterine device“) ili češće zvani „spirale“, popularno sredstvo kontracepcije u žena. Spirale su danas dostupne u nekoliko oblika i veličina, ugrađuju se u maternicu, a izgrađene su od raznih materijala kao što je bakar ili plastika. Poznato je da umetanje IUD-a stimulira upalnu reakciju i reakciju na strano tijelo u uterusu, što zauzvrat uzrokuje stanične i biokemijske promjene u endometriju i sekretu maternice. Te su promjene odgovorne za kontracepcijske učinke. Međutim, IUD su povezani i s rizikom od infekcije zdjelice, obilnijih mjesečnica, menstrualnih grčeva i iznad svega komplikacija povezanih s mikrobnom kolonizacijom. Vagina i okolna područja reproduktivnog trakta sadrže veliki broj bakterija i gljiva. Njihova migracija u gornji dio ženskog urogenitalnog trakta dovodi do nelagode i potencijalno infekcije. Pokazalo se da uklonjene spirale najčešće sadrže *S. epidermidis*, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Enterococcus* spp. i anaerobne laktobacile. Većina kontaminiranih spirala sadržava Gram pozitivne bakterije, osobito stafilokoke, ali infekcije uzrokovane Gram negativnim bakterijama i gljivama obično su ozbiljnije i od većeg značenja. Sekret maternice pod normalnim uvjetima aktivno rješava takve infekcije, ali prisutnost spirale predstavlja čvrstu površinu za pričvršćivanje i idealnu nišu za formiranje i bujanje biofilma. Za liječenje takvih infekcija potrebne su visoke doze antibiotika, a često je jedina opcija uklanjanje spirale. Terapijski pristupi koji djeluju na ekspresiju ili aktivnost gena uključenih u stvaranje mikrobnog biofilma mnogo obećavaju i pružaju nove i potencijalno korisne alternative trenutnim terapijama (22).

7. RASPRAVA

Mikrobni biofilmovi su kompleksne zajednice vezane za površinu koje se obično sastoje od jedne ili više vrsta bakterija koje zajedno napreduju i natječu se za ograničene životne resurse. Bakterije koje rastu u biofilmovima su vrlo tolerantne na antibiotike i otporne prema imunološkom sustavu domaćina, stoga djeluju kao važan čimbenik virulencije koji igra ključnu ulogu u perzistenciji i patogenezu biofilm-infekcije. Već davno su bakterijski biofilmovi otkriveni kao mogući uzročnici kroničnih infekcija i bolesti u ljudi. Međutim, interakcije između domaćina i biofilma dugo vremena nisu bile razjašnjene i stoga su ograničavale naše znanje o tome kako biofilmovi sudjeluju u patogenezu bolesti (5). Bakterije u biofilmovima su prilagođene na rast na površinama, a većina proizvodi adhezine i izvanstanične polimere koji omogućuju stanicama da čvrsto prijanjaju, ne samo na biotičke ili abiotičke površine već i na susjedne stanice. Stanične aktivnosti, uključujući proizvodnju matriksa, međustaničnu signalizaciju i pokretljivost sugeriraju da mikroorganizmi u biofilmu vrlo blisko surađuju i sudjeluju u zajedničkim aktivnostima. Kao rezultat toga, biofilmovi se često uspoređuju s višestaničnim organizmima gdje se stanice diferenciraju za specijalizirane funkcije (23).

Umreženost bakterijskog biofilma je vrlo složena pa bakterije lako mogu učinkovito izbjeći imunološke reakcije domaćina uključujući i urođene i adaptivne imunološke odgovore. Biofilmovi uglavnom fokusiraju svoje obrambene mehanizme protiv polimorfonuklearnih stanica (neutrofila), glavnih stanica imunološkog sustava koje napadaju mjesta infekcije. Biofilmovi mogu otpuštati i različite toksične produkte odgovorne za borbu protiv antimikrobne aktivnosti neutrofilnih izvanstaničnih zamki („neutrophil extracellular traps“, NET) u domaćinu, ili neki od biofilmova mogu proširiti svoju mrežu i postati koncentrirani kako bi izbjegli djelovanje sustava komplementa domaćina. Štoviše, biofilmovi imaju tendenciju oslabiti odgovor T-stanica domaćina što sprječava uklanjanje infekcije pa tako ona postaje

kronična (3). Upravo takve infekcije se najčešće vežu uz biofilm prisutan na biomaterijalima i mnogim tkivima.

8. ZAKLJUČCI

Infekcije povezane s biofilmom su česti problem u kliničkoj praksi i važno je razumjeti njihovu etiologiju, epidemiologiju i patogenezu kako bi se mogle pravovremeno prepoznati i sukladno tome adekvatno liječiti. One predstavljaju ozbiljan rizik za pacijente s kroničnim oboljenjima, kao primjerice one s cističnom fibrozom, kroničnom opstruktivnom plućnom bolesti (KOPB), kroničnim ranama ili osteomijelitisom. Također, jedna od najugroženijih skupina bolesnika su i kirurški pacijenti jer, osim što su često imunokompromitirani radi samog zahvata, kirurški implantati i proteze pružaju savršene površine za nakupljanje bakterija i rast biofilma. Zbog povećane tolerancije i rezistencije na antimikrobne lijekove, terapijski postupci u liječenju biofilm-infekcija su ograničeni i često uključuju visoke doze antibiotika, rezervne antibiotike ili uklanjanje proteza. Stoga su potrebna daljnja istraživanja kako bi se u kliničku praksu uvele modernije metode dijagnostike i liječenja koje su još u eksperimentalnoj fazi, primjerice korištenje slabih kiselina, ozračivanje svjetlošću te primjena virusa bakteriofaga.

9. SAŽETAK

Prvi čvrsti dokaz za postojanje mikroorganizama svijetu je predstavio nizozemski znanstvenik Antonie van Leeuwenhoek 1663. godine. Ukazao je i na mogućnost postojanja organizirane zajednice mikroorganizama koja se u modernoj znanosti naziva biofilm. Međutim, koncept biofilma kao glavni način života bakterija populariziran je zahvaljujući radu Williama Costertona. Danas znamo da je razumijevanje biofilmova od iznimne važnosti jer je 65-80% infektivnih bolesti povezano s njima.

Bakterijski biofilm se sastoji od nakupine sesilnih bakterijskih stanica koje žive uklopljene u EPS. Glavne komponente EPS-a su polisaharidi i proteini koji stvaraju glavni strukturni okvir matriksa. Razvoj biofilma na bilo kojoj površini uključuje dobro organiziran niz pet uzastopnih događaja: 1. Početno reverzibilno pričvršćivanje planktonskih mikroorganizama na podlogu, 2. Ireverzibilno pričvršćivanje mikroorganizama na podlogu, 3. Razvoj mikrokolonija adheriranih mikroorganizama, 4. Izlučivanje EPS-a i razvoj trodimenzionalne zrele zajednice, 5. Disperzija mikroorganizama iz zajednice.

Infekcije povezane s biofilmom se općenito kategoriziraju kao tkivne infekcije i infekcije povezane s biomaterijalima. Primarna razlika između dva tipa infekcija je u tome što infekcije povezane s tkivnim biofilmom ne uključuju površinu stranog tijela. Za nekoliko infekcija se sa sigurnošću može reći da su rezultat stvaranja biofilma u tkivima, a to su, među ostalima, infektivni endokarditis (IE), osteomijelitis, kronične rane koje ne zacjeljuju i infekcije pluća u pacijenata s CF ili kroničnom opstruktivnom plućnom bolešću (KOPB). BAI povezane s medicinskim uređajima nastaju kada mikroorganizmi prionu na ugrađeni uređaj i postoje povoljni uvjeti za razvoj biofilma. Zabilježeno je stvaranje biofilma na gotovo svim medicinskim uređajima koji se trenutno koriste.

Ključne riječi: biofilm; detekcija kvoruma; biomolekule, infekcija

10. SUMMARY

The first solid evidence for the existence of microorganisms was presented by Antonie van Leeuwenhoek in 1663. He also pointed to the possibility of the existence of an organized community of microorganisms, which modern science calls biofilm. However, the concept of biofilm as the main mode of bacterial life was popularized by William Costerton. Today we know that understanding biofilms is extremely important because 65-80% of infectious diseases are associated with them.

Bacterial biofilm consists of a cluster of sessile bacterial cells that live embedded in EPS. The main components of EPS are polysaccharides and proteins that create the main structural framework of the matrix. The development of a biofilm on any surface involves a well-organized sequence of five sequential events: 1. Initial reversible attachment of planktonic microorganisms to the substrate, 2. Irreversible attachment of microorganisms to the substrate, 3. Development of microcolonies, 4. Excretion of EPS and development of a three-dimensional mature biofilm community, 5. Dispersion of microorganisms from the community.

Biofilm-associated infections are generally categorized as tissue-associated infections and medical device-associated infections. The primary difference is that tissue biofilm-related infections do not involve the surface of the foreign body. Infections that result from tissue biofilm formation include infective endocarditis, osteomyelitis, chronic non-healing wounds, and lung infections in patients with CF or chronic obstructive pulmonary disease. Medical device associated BAI occurs when microorganisms adhere to the implanted device and favorable conditions for biofilm development exist. Biofilm formation has been reported on almost all currently used medical devices.

Key words: biofilm; quorum sensing; biomolecules; infection

11. LITERATURA

1. Chaminda Jayampath Seneviratne. Microbial Biofilms. CRC Press; 2017.
2. Chandki R, Banthia P, Banthia R. Biofilms: A microbial home. J Indian Soc Periodontol [Internet]. 2011 [citirano 25.5.2023.] 2011;15(2):111–4. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3183659/>
3. Rina Rani Ray, Nag M, Lahiri D. Biofilm-Mediated Diseases: Causes and Controls. Springer Nature; 2021.
4. Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. Biofilm matrixome: Extracellular components in structured microbial communities. Trends Microbiol [Internet]. 2020 [citirano 27.5.2023.] 2020;28(8):668–681. Dostupno na: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0966842X20300871?token=564D8AA0AA908F18D732CD6AF9D12300BF0B1A1A2B360A6B9926B8FC840CFCF4260A7B1127A772152BDC7B17C66B93B0>
5. Nag M, Lahiri D. Analytical Methodologies for Biofilm Research. Springer; 2021.
6. Immunology.org [Internet]. Biofilms and their role in pathogenesis. [citirano 5.6.2023.] Dostupno na: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/pathogens-disease/biofilms-and-their-role-pathogenesis>
7. Rumbaugh KP, Sauer K. Biofilm dispersion. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2020 [citirano 5.6.2023.] 2020;18(10):571–586. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8564779/>
8. Merriam-Webster Dictionary [Internet]. Quorum sensing. [citirano: 5.6.2023.] Dostupno na: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/quorum%20sensing>
9. ASM.org [Internet]. How Quorum Sensing Works. [ažurirano 12.6.2020.; citirano: 9.6.2023.] Dostupno na: <https://asm.org/Articles/2020/June/How-Quorum-Sensing-Works>

10. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc* [Internet]. 2018 [citirano 9.6.2023.] 2018;81(1):7–11. Dostupno na: https://journals.lww.com/jcma/Fulltext/2018/01000/Bacterial_biofilm_and_associated_infections.3.aspx
11. Di G, Oliva A, María Guembe. The Current Knowledge on the Pathogenesis of Tissue and Medical Device-Related Biofilm Infections. *Microorganisms* [Internet]. 2022 [citirano: 10.6.2023.] 2022;10(7):1259–9. Dostupno na: https://www.mdpi.com/2076-2607/10/7/1259?type=check_update&version=1#
12. Høiby N. Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to potential therapies. *J Cyst Fibros* [Internet]. 2002 [citirano 10.6.2023.] 2002;1(4):249–54. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569199302001042>
13. Wei D, Zhu X-M, Chen Y-Y, Li X-Y, Chen Y-P, Liu H-Y, et al. Chronic wound biofilms: Diagnosis and therapeutic strategies. *Chin Med J (Engl)* [Internet]. 2019 [citirano 12.6.2023.] 2019;132(22):2737–2744. Dostupno na: https://journals.lww.com/cmj/Fulltext/2019/11200/Chronic_wound_biofilms_diagnosis_and_therapeutic.13.aspx
14. Sen CK, Roy S, Mathew-Steiner SS, Gordillo GM. Biofilm management in wound care. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 2021 [citirano 12.6.2023.] 2021;148(2):275e–288e. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8439557/>
15. Gedif Meseret A. Oral biofilm and its impact on oral health, psychological and social interaction. *Int J Oral Dent Health* [Internet]. 2021 [citirano 12.6.2023.] 2021;7:127. Dostupno na: <https://clinmedjournals.org/articles/ijodh/international-journal-of-oral-and-dental-health-ijodh-7-127.php?jid=ijodh>

16. Das S, Neelam Amit Kungwani. *Understanding Microbial Biofilms*. Elsevier; 2022.
17. Deng Y, Lv W. *Biofilms and Implantable Medical Devices*. Woodhead Publishing; 2016.
18. McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manring MM, Calhoun JH, Shirtliff M, et al. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol* [Internet]. 2014 [citirano 16.6.2023.] 2014;9(8):987–1007. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4407677/>
19. Pelling H, Nzakizwanayo J, Milo S, Denham EL, MacFarlane WM, Bock LJ, et al. Bacterial biofilm formation on indwelling urethral catheters. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2019 [citirano 16.6.2023.] 2019;68(4):277–293. Dostupno na: <https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/lam.13144>
20. Kackar S, Suman E, Kotian MS. Bacterial and fungal biofilm formation on contact lenses and their susceptibility to lens care solutions. *Indian J Med Microbiol* [Internet] 2017 [citirano 16.6.2023.] 2017;35(1):80–84. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0255085720302413>
21. AAO.org [internet]. Eye Infections From Contact Lenses [ažurirano: 3.5.2023.; citirano: 18.6.2023.]. Dostupno na: <https://www.aao.org/eye-health/diseases/contact-lens-related-eye-infections>
22. Pruthi V, Al-Janabi A, Pereira B. Characterization of biofilm formed on intrauterine devices. *Indian J Med Microbiol*. 2003;21(3):161–5.
23. Mahmoud Ghannoum, Parsek M, Whiteley M, Mukherjee PK. *Microbial Biofilms*. John Wiley & Sons; 2020.

12. ŽIVOTOPIS

Vanja Kotur rođen je 7. srpnja 1997. godine u Zagrebu. Djetinjstvo provodi u Karlovcu gdje pohađa Osnovnu školu Grabrik te nakon nje upisuje Gimnaziju Karlovac. Tijekom osnovnoškolskog i srednjoškolskog obrazovanja izvanškolski uči engleski jezik kojeg usavršava do C1 razine. 2016. godine upisuje Integrirani preddiplomski i diplomski studij Medicine na Medicinskom fakultetu u Rijeci. Tijekom pandemije COVID-19 bavi se volonterskim radom na OHBP-u. Osim toga, tijekom studija sudjeluje na 6. Školi intervencijske radiologije te na 7. Kongresu hitne medicine kao aktivan sudionik. Član je i Međunarodne udruge studenata medicine (CroMSIC) te se aktivno služi engleskim i njemačkim jezikom.