

Raport/Studiu

Compararea rezistenței microbiene în biofilme cu o singură specie vs. complexe efectuat în cadrul proiectului *Abordarea bioeconomică a agenților antimicrobieni – utilizare și rezistență*

(cod - PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0361).

Colectiv de redacție:

Coordonatori: Prof. dr. Carmen Panaitescu, Prof. dr. Gabriela Tănăsie

Membri: Asist. univ. dr. Csilla Zambori, Doctorand Brigitta Kis

Data finalizării: 15.11.2019

Acknowledgements

Activities under this work were carried out in the *Research Laboratory Complex "Horia Cernescu"* - financed by project *"A bio-economical approach of the antimicrobial agents - use and resistance"*, in the frame of contract PCCDI 7/19.03.2018, code: PN-III P1-1.2-FPRD-2017.

1. Introducere

Mecanismul de formare a biofilmului mono- sau polimicrobian parcurge mai multe etape succesive.

Fixarea inițială: începe cu o atașare reversibilă de o suprafață a bacteriilor planctonice. Aceste bacterii aderă foarte slab la suprafață, legându-se prin forțe Van der Waals.

Atașarea ireversibilă: dacă celulele planctonice nu sunt îndepărtați imediat de pe suprafață, ei se pot ancora foarte ușor, folosindu-se de structurile de adeziune celulară, cum ar fi pili.

Maturizarea primară: primele celule facilitează sosirea altor celule prin furnizarea diverselor situsuri de adeziune, prin inițierea construcției matricei, care ține unit biofilmul. În timpul colonizării aceste celule sunt capabile să comunice prin: "molecule semnal".

Maturizarea secundară: odată cu inițializarea colonizării, biofilmul crește prin combinația dintre diviziunea celulară și recrutarea de celule noi.

Etapa finală a formării biofilmelor este cea de dezvoltare, care reprezintă stadiul în care biofilmul este stabil. În această etapă se poate modifica numai în formă și dimensiune. Dezvoltarea unei colonii de celule agregate sub forma biofilmului poate permite să fie din ce în ce mai rezistent la antibiotice ([O'Toole G., et.al. 2000](#), [Stoodley, P. et. al. 1997](#)).

Dispersia de celule din colonia biofilmului: în această etapă biofilmele pot să se răspândească și de asemenea să se colonizeze pe suprafețe noi. Cele două enzime care degradează matricea extracelulară a biofilmului sunt: dispersin B (DspB) și deoxiribonucleazele ([Monds, R.D., O'Toole, G.A., 2009](#)).

Interacțiunile dintre bacterii depind foarte mult de context. Aceste interacțiuni sunt complexe și dinamice. Compoziția și distribuția spațială sunt cele mai importante pentru populația din biofilm și vor influența probabil toate proprietățile sale fizice. Cele mai multe studii publicate s-au concentrat pe mecanismele de dezvoltare a sinergiei sau antagonismului între două specii din cadrul unei infecții ([Nagant, M., et.al. 2010](#)).

Aceste interacțiuni pot fi directe, cum ar fi o relație sinergetică evoluată între două specii în care fiecare produce o substanță care beneficiază de cealaltă, sau indirectă, cum ar fi producția unei enzime care inactivează un antibiotic ([Makovcova J., et.al. 2017](#)).

Sinergia microbiană poate fi definită ca o interacțiune de cooperare între două sau mai multe specii de microbi care produce un efect care nu este obținut de o singură specie. În biofilme și infecții legate de biofilm, aceste efecte includ creșterea, toleranța antimicrobiană, virulența și producerea sporită de exopolizaharidă (EPS). O altă interacțiune cooperativă clasică este alimentația metabolică încrucișată sau sintrofia, unde o specie realizează un produs secundar metabolic care îmbunătățește creșterea unui vecin ([Sutherland, I.W. 2001](#)).

Compararea rezistenței microbiene în biofilme cu o singură specie vs. complexe

Antagonismul microbial, denumit și antibiotic, poate fi definit ca suprimarea unei specii microbiene de către alta. Mecanismele antagonice includ: producția de factori careucid sau inhibă creșterea vecinilor, producerea de semnale chimice care pot interfera sau deranja comportamentul sau fiziologia bacteriilor. Investigarea relațiilor antagonice între microbi nu numai că oferă o perspectivă asupra comportamentului bacteriilor, dar poate deține și un rol important pentru perturbarea structurii și compoziției biofilmului, ceea ce ar putea duce la noi tratamente pentru infecțiile legate de biofilm ([Omar Camarillo-Márquez et.al., 2018](#)).

Există diferite tipuri de infecții, care sunt adesea cauzate de o populație multispecie de microbi, despre care se crede că sunt asociate cu biofilmul. Cele mai frecvente tipuri de infecții polimicrobiene, asociate cu biofilmul sunt cele care apar în plămâni, urechea internă, tractul urinar, cavitatea bucală, în răni și cele legate de diferite dispozitive medicale. În general biofilmele prezente pe aceste locuri afectează în mod negativ gazda și potențiază infecția prin: provocarea unei stări inflamatorii cronice care duce la deteriorarea colaterală a țesutului din jur protejând microbii de antibiotice și factorii imunitari gazdă ([Brogden K.A., et.al., 2005](#)).

Deși cea mai mare parte a accentului pe biofilme medicale este pus pe potențialul lor patogen și rolul lor în boală, este de remarcat faptul că biofilmele joacă probabil și un rol protector in vivo.

Cunoașterea compoziției microbiene a biofilmului este esențială pentru prevenirea apariției bolilor sistemice.

Necesitatea aprofundării cercetărilor, cu privire la rolul biofilmului microbial în evoluția bolilor sistemice, se bazează pe existența mai multor factori:

- biofilmele sunt foarte greu de tratat cu substanțe antimicrobiene;
- biofilmele cresc capacitatea transferului de gene între bacterii (bacteriile care sunt rezistente la substanțele antimicrobiene pot transfera anumite gene rezistente la bacteriile învecinate sensibile), prin transferul de gene o bacterie avirulentă poate deveni puternic virulentă;
- există anumite specii bacteriene care comunică între ele, în cadrul biofilmului polimicrobial (odată ce densitatea acestora crește, microorganismele secretă anumite substanțe cu greutate moleculară mică și transmit semnale atunci când populația bacteriană a ajuns la un anumit prag); acest proces se numește simțul quorum (QS) și este responsabil de virulența bacteriană ([Shadaba A., Steven M. Opal 2008, Shirtliff, M.E., et.al. 2002](#));
- bacteriile de la nivelul biofilmului polimicrobial au capacitatea de a exprima anumite fenotipuri virulente; aceste fenotipuri nu au putut fi descoperite în trecut deoarece bacteriile au fost cultivate pe medii nutritive îmbogățite, în condiții specifice de planctonicitate, în timp ce, condițiile de creștere sunt diferite (substanțele nutritive și oxigenul sunt limitate);
- bacteriile de la nivelul biofilmului sunt protejate de acțiunea factorilor naturali de apărare ai organismului;

Compararea rezistenței microbiene în biofilme cu o singură specie vs. complexe

- datorită structurii biofilmului răspunsul sistemului imun se produce doar față de antigenele situate la suprafața acestuia, iar acțiunea anticorpilor, respectiv a altor protein serice și salivare, asupra biofilmului este redusă sau nulă (Marshall, K.,C. 1992).

Anumite studii au arătat că anticorpilor sintetizați de organismul gazdă pot acționa asupra microorganismelor planctonice dar nu și asupra celor încorporate la nivelul biofilmului.

În concluzie, fagocitele nu pot acționa asupra bacteriilor încorporate în matricea polizaharidică ceea ce va duce la eliberarea unui număr mare de enzime și citokine pro-inflamatorii care stau la baza producerii inflamației și distrugerea țesuturilor învecinate.

2. Creșterea biofilmelor monomicrobiene vs bimicrobiene

Pentru experimentele efectuate au fost pregătite materialele, instrumentele și echipamentele necesare. Sterilizarea s-a efectuat corespunzător în autoclave, în spații bine precizate și dotate corespunzător, urmată de dezinfectia suprafețelor de lucru, a mâinilor. Probele de material patologic au fost prelevate de la mai mulți pacienți, apoi au fost prelucrate din punct de vedere bacteriologic, în conformitate cu metodologia de izolare și tipizare a stafilococilor și *E.coli* (vezi raportul 2.2.1.). Ulterior au fost pregătite mediile de cultură necesare pentru creșterea tulpinilor izolate și identificate de *Staphylococcus spp.* și *E. coli* (mediu solid: agar cu sânge, bulion BHI). Au fost prelucrate 10 tulpini de *Staphylococcus aureus* și 11 tulpini de *E. coli* recoltate din probe biologice umane diferite.

Tulpinile de *Staphylococcus aureus* utilizate pentru formarea biofilmelor au fost: **CL9002, CN4099, CN7897, CP7487, CO0587, CO1438, CP8150, CN3606, CP7107**. Dintre aceste tulpini toate au fost recoltate din produsul biologic: secreție plagă, în afară de tulpina **CN7897**, care a fost recoltat din lichidul cefalorahidian.

Compararea rezistenței microbiene în biofilme cu o singură specie vs. complexe

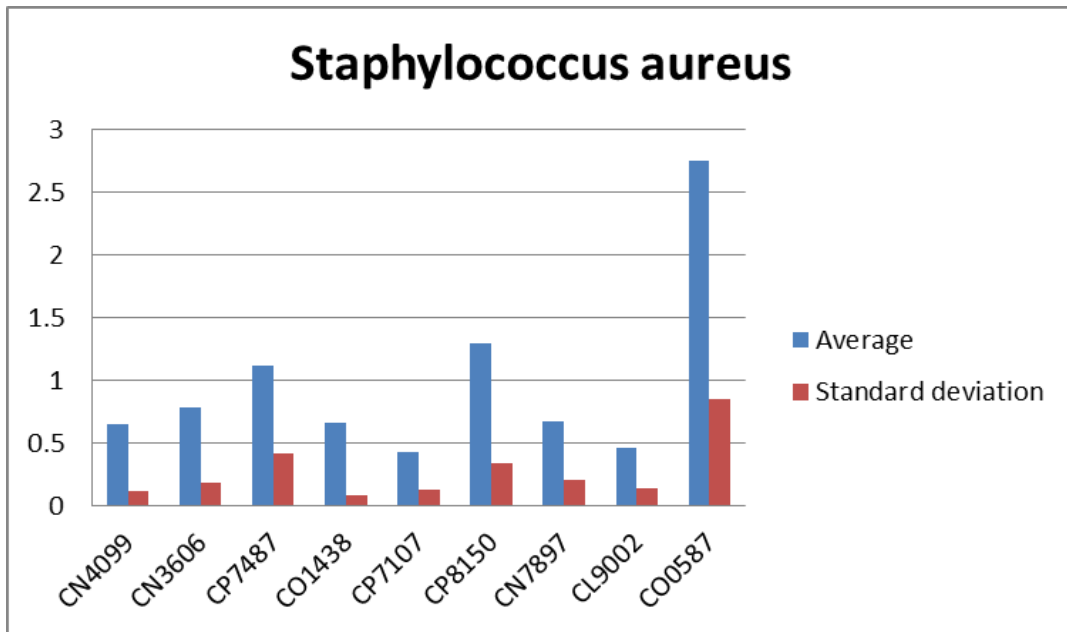


Fig. 1. Prezentarea grafică a biofilmelor formate de *Staphylococcus aureus*

Tulpinile de *Escherichia coli* utilizate pentru formarea biofilmelor au fost: **CO1453**- produs biologic din secreție plagă, **CO1320**, **CT9376**, **CV1876**- produs biologic din urocultură, **CT6950**, **CU0181**- aspirat bronșic, **DK1034**, **DM3527**, **CT8276**- produs biologic din hemocultură, **CO1165**- produs biologic din lichid cefalorahidian, **CP9286**- produs biologic din spermocultura.

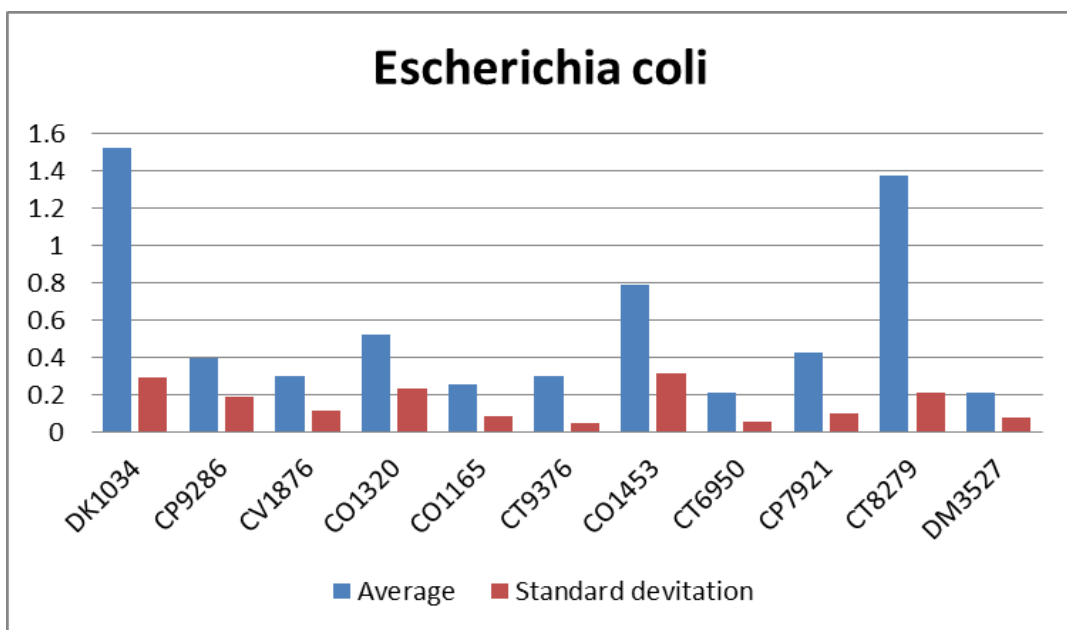


Fig. 2. Prezentarea grafică a biofilmelor formate de *Escherichia coli*

Compararea rezistenței microbiene în biofilme cu o singură specie vs. complexe

Staphylococcus aureus este o bacterie gram pozitivă, formează un biofilm multistratificat, dispuși în grămezi, izolați sau în lanțuri scurte, încorporat într-un glicocalix sau un strat de slime. Unii cercetători au descris componenta solidă a glicocalixului, fiind compusă în principal din acizi teichoici (80%), proteine stafilococice și gazda. Pe agar de sânge formează colonii mari, rotunde, alb-gălbui, apar sub forma unei aglomerări sau ciorchine. S-a observat că biofilmele s-au depus direct pe fundul plăcii cu 96 de godeuri, nu s-au atașat de perete.

Escherichia coli este o bacterie lactozo pozitivă, gram-negativă, care apare la microscop sub formă de bastonașe. Biofilmul de *E. coli* crește de obicei ca o colonie circulară compactă atunci când este inoculat pe o placă de agar. Coloniile au culoarea alb deschis sau bej cu o textură strălucitoare. Câteodată apare un mucus sau un film tulbure pe toată suprafața plăcii. Coloniile mai vechi prezintă adesea centrul mai închis la culoare. În plăci cu 96 de godeuri biofilmele apar pe marginea godeurilor, așezate în colonii, mijlocul godeurilor fiind goale.

Tabel 1: Media și deviația standard a biofilmelor formate de tulpinile *Staphylococcus aureus*

S. aur.	CL9002	CN4099	CN7897	CP7487	CO0587	CO1438	CP8150	CN3606	CP7107
Media	0.65214	0.786	1.11671	0.65971	0.42957	1.30057	0.67122	0.46071	2.75342
Deviația standard	0.12056	0.18134	0.41830	0.08185	0.12531	0.34459	0.20902	0.14567	0.85232

Tabel 2: Media și deviația standard a biofilmelor formate de *Escherichia coli*

E. coli	DK1034	CP9286	CV1876	CO1320	CO1165	CT9376	CO1453	CT6950	CP7921	CT8279	DM3527
Media	1.521	0.39885	0.29842	0.52285	0.25757	0.30185	0.78714	0.21071	0.42971	1.37642	0.213571
Deviația standard	0.29293	0.18705	0.11268	0.23205	0.08678	0.05101	0.31579	0.05333	0.09893	0.20845	0.074678

Este bine cunoscut faptul că speciile din genul *Staphylococcus* și *E. coli* produc cel mai frecvent infecții bacteriene cu evoluții grave atât la om cât și la animale. Astfel, terapia antimicrobiană este greu de stabilit, datorită rezistenței acestor microorganisme la numeroase substanțe antimicrobiene folosite pe scară largă în tratamentele de combatere a bolilor.

S-a observat că toate tulpinile bacteriene au format un biofilm clar, după cazuri: slab, mediu sau puternic. În cazul bacteriei *Escherichia coli* cel mai puternic biofilm s-a format la tulpinile: DK1034 și CT8279, ambele fiind recoltate din hemocultură (fig. 2. și tabel 2).

În cazul bacteriei *Staphylococcus aureus* cel mai puternic biofilm s-a format la tulpinile: CO0587 (secreție plagă), CP8150 (secreție plagă), CP7487 (secreție plagă), CN7897 (LCR) (CO1438 și CP7107 secreție plagă) (fig. 1 și tabel 1.)

CO0587

(*Staphylococcus aureus*, produs biologic: secreție plagă, fenotip de rezistență: MRSA)

Determinarea densității optice: la absorbanta de 570 nm au ieșit valorile de la 1.276- 3.698, s-a înșămânțat bacteria la o valoare de 3.070. După 24 de ore de la incubare, s-au format 36 de colonii de biofilme (10^{-5}).

CP8150

(*Staphylococcus aureus*, produs biologic: secreție plagă, fenotip de rezistență: Rezistent la Cd, MRSA)

Determinarea densității optice: la absorbanta de 570 nm au ieșit valorile de la 0.299- 1.940, s-a înșămânțat bacteria la o valoare de 1.636. După 24 de ore de la incubare s-au format 53 de colonii de biofilme (10^{-4}).

CP7487

(*Staphylococcus aureus*, produs biologic: secreție plagă, fenotip de rezistență: MRSA)

Determinarea densității optice: la absorbanta de 570 nm au ieșit valorile de la 0.207- 1.698, s-a înșămânțat bacteria la o valoare de 0.871. După 24 de ore de la incubare, s-au format 72 de colonii de biofilme (10^{-5}).

CN4099

(*Staphylococcus aureus*, produs biologic: secreție plagă, fenotip de rezistență: rezistent la Cd)

Determinarea densității optice: la absorbanta de 570 nm au ieșit valorile de la 0.399- 1.480, s-a înșămânțat bacteria la o valoare de 1.526. După 24 de ore de la incubare s-au format 64 de colonii de biofilme (10^{-4}).

CN7897

Compararea rezistentei microbiene in biofilme cu o singura specie vs. complexe

(*Staphylococcus aureus*, produs biologic: LCR, fenotip de rezistenta: MRSA)

Determinarea densitatii optice: la absorbanta de 570 nm au iesit valorile de la 0.107- 1.578, s-a insamantat bacteria la o valoare de 0.788. După 24 de ore de la incubare, s-au format 57 de colonii de biofilme (10^{-5}).

CN3606

(*Staphylococcus aureus*, produs biologic: secretie plaga, fenotip de rezistenta: MRSA)

Determinarea densității optice: la absorbanta de 570 nm au iesit valorile de la 0.562 - 0.859, s-a insamantat bacteria la o valoare de 0.573. După 24 de ore de la incubare s-au format 59 de colonii de biofilme (10^{-4}).

C01438

(*Staphylococcus aureus*, produs biologic: secretie plaga, fenotip de rezistenta: MRSA)

Determinarea densității optice: la absorbanta de 570 nm au iesit valorile de la 0.362- 0.759, s-a insamantat bacteria la o valoare de 0.683. După 24 de ore de la incubare s-au format 55 de colonii de biofilme (10^{-4}).

CP7107

(*Staphylococcus aureus*, fenotip de rezistenta: MRSA, MLSB)

Determinarea densității optice: la absorbanta de 570 nm au iesit valorile de la 0.226- 0.819, am ales sa insamantez bacteria la o valoare de 0.543. După 24 de ore de incubare s-au format 43 de colonii de biofilme (10^{-4}).

CL9002

(*Staphylococcus aureus*, produs biologic: secretie plaga, fenotip de rezistența: MRSA+ cumul de mecanisme)

Determinarea densității optice: la absorbanta de 570 nm au iesit valorile de la 0.450- 2.396, s-a insamantat bacteria la o valoare de 0.576. După 24 de ore de la incubare, s-au format 54 de colonii de biofilme (10^{-5}).

DK1034

(*E. Coli*, produs biologic: hemocultură, fenotip de rezistenta: rezistent la sulfamide)

Determinarea densității optice: la absorbanta de 570 nm au iesit valorile de la 0.273- 0.843, s-a insamantat bacteria la o valoare de 0.982. După 24 de ore de la incubare s-au format 97 de colonii de biofilme (10^{-3}).

CT8279

(*E. Coli*, produs biologic: hemocultura, fenotip de rezistenta: BLSE)

Compararea rezistentei microbiene in biofilme cu o singura specie vs. complexe

Determinarea densitatii optice: la absorbanta de 570 nm au iesit valorile de la 0.177- 1.142, s-a insamantat bacteria la o valoare de 1.478. După 24 de ore de la incubare, s-au format 76 de colonii de biofilme (10^{-3}).

C01453

(*E. coli*, produs biologic: secreție plagă, fenotip de rezistenta: cumul de mecanisme)

Determinarea densității optice: la absorbanta de 570 nm au iesit valorile de la 0.234- 0.291, s-a insamantat bacteria la o valoare de 0.147. După 24 de ore de la incubare s-au format 91 de colonii de biofilme (10^{-3}).

CP9286

(*E. Coli*, produs biologic: spermoc, fenotip de rezistenta: rezistent la sulfamide)

Determinarea densității optice: la absorbanta de 570 nm au iesit valorile de la 0.443- 0.783, s-a insamantat bacteria la o valoare de 0.542. După 24 de ore de la incubare s-au format 82 de colonii de biofilme (10^{-3}).

CP7921

(*E. Coli*, produs biologic: urocultură, fenotip de rezistenta: FQ, Rezistent la sulfamide, secretor de penicilinază)

Determinarea densității optice: la absorbanta de 570 nm au iesit valorile de la 0.243- 0.603, s-a insamantat bacteria la o valoare de 0.522. După 24 de ore de la incubare s-au format 88 de colonii de biofilme (10^{-3}).

C01165

(*E. Coli*, produs biologic: hemocultura, fenotip de rezistenta: BLSE)

Determinarea densitatii optice: la absorbanta de 570 nm au iesit valorile de la 0.277- M1.557, s-a insamantat bacteria la o valoare de 1.424. După 24 de ore de la incubare, s-au format 82 de colonii de biofilme (10^{-3}).

CT6950

(*E. coli*, produs biologic: aspirat bronșic, fenotip de rezistenta: BLSE)

Determinarea densitatii optice: la absorbanta de 570 nm au iesit valorile de la 0.182- 1.127, s-a insamantat bacteria la o valoare de 1.134. După 24 de ore de la incubare s-au format 90 de colonii de biofilme (10^{-3}).

CP8272

(*E. coli*, produs biologic: hemocultură, fenotip de rezistenta: BLSE)

Determinarea densitatii optice: la absorbanta de 570 nm au iesit valorile de la 0.687- 1.577, s-a insamantat bacteria la o valoare de 1.344. După 24 de ore de la incubare s-au format 85 de colonii de biofilme (10^{-3}).

Compararea rezistentei microbiene in biofilme cu o singura specie vs. complexe

CV1876

(*E. coli*, produs biologic: urocultură, fenotip de rezistenta: BLSE)

Determinarea densitatii optice: la absorbanta de 570 nm au iesit valorile de la 0.887- 0.977, s-a insămânțat bacteria la o valoare de 1.044. După 24 de ore de la incubare s-au format 93 de colonii de biofilme (10^{-3}).

C01320

(*E. coli*, produs biologic: hemocultură, fenotip de rezistenta: cumul de mecanisme)

Determinarea densității optice: la absorbanta de 570 nm au iesit valorile de la 0.574- 0.826, s-a insămânțat bacteria la o valoare de 0.577. După 24 de ore de la incubare s-au format 93 de colonii de biofilme (10^{-3}).

DM3527

(*E. coli*, produs biologic: hemocultură, fenotip de rezistenta: cumul de mecanisme)

Determinarea densității optice: la absorbanta de 570 nm au iesit valorile de la 0.144- 0.286, s-a insămânțat bacteria la o valoare de 0.157. După 24 de ore de la incubare s-au format 96 de colonii de biofilme (10^{-3}).

CT9376

(*E. coli*, produs biologic: urocultura, fenotip de rezistenta: cumul de mecanisme)

Determinarea densității optice: la absorbanta de 570 nm au iesit valorile de la 0.244- 0.176, s-a insămânțat bacteria la o valoare de 0.197. După 24 de ore de la incubare s-au format 78 de colonii de biofilme (10^{-3}).

DK0336

(*E. coli*, produs biologic: hemocultura, fenotip de rezistenta: cumul de mecanisme)

Determinarea densității optice: la absorbanta de 570 nm au iesit valorile de la 1.057- 2.655, s-a insămânțat bacteria la o valoare de 1.439. După 24 de ore la incubare s-au format 92 de colonii de biofilme (10^{-3}).

Cuesta I și colab. (Cuesta, A.I. și colab., 2010) au studiat rolul speciilor din genul *Staphylococcus* și *E.coli* de a forma biofilm și au constatat că majoritatea sunt rezistente la acțiunea unui număr mare de substanțe antimicrobiene, datorită capacității de transfer a unor gene rezistente la acțiunea substanțelor antimicrobiene.

Rezultatele obținute în urma cercetărilor anterioare, care au menționat rezistența unor tuplini bacteriene din genul *Staphylococcus* și *E. coli* izolate de la nivelul probelor biologice, împreună cu datele obținute în urma experimentului efectuat de noi stau la baza a două concluzii importante:

- tulpinile din genul *Staphylococcus* și *E. coli* izolate din probele biologice, au capacitatea de a forma biofilme, aceasta fiind dependentă de proveniența sursei biologice.

Compararea rezistenței microbiene în biofilme cu o singură specie vs. complexe

- rezistența microorganismelor crește odată cu crearea de condiții optime pentru dezvoltarea proceselor patologice, respectiv la nivelul bi-biofilmelor sunt create condiții optime de dezvoltare și rezistență comparativ cu monobiofilmele (tabel 3 și 4).

În cazul biofilmelor **polimicrobiene** au fost folosite următoarele perechi de tulpini (tabel 3):

Tabel 3: Tulpinile de *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli* folosite pentru formarea biofilmelor polimicrobiene

<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	Deviația standard
CO1438	CO1453	2.45685
CO1438	CT9376	0.35214
CO1438	CU0181	0.29842
CP8150	CU0181	0.52285
CP8150	CO1165	0.752154
CN7897	CO1165	0.272541
CN7897	CO1165	0.145221
CO1438	CT8279	1.754214
CN4099	DK1034	0.98521
CN3606	CP9286	0.54784
CP7487	CV1876	0.74521
CP7102	CO1320	1.15474
CL9002	CT6950	1.02471
CO0587	CP7921	0.78951
CO1438	DM3527	1.19584

Perechile de tulpini utilizate pentru formarea biofilmelor polimicrobiene s-au ales după o prealabilă selecție a biofilmelor monomicrobiene (cele care au format cel mai dens/puternic biofilm), de asemenea s-a ținut cont și de produsul biologic din care s-au recoltat tulpinile. În cazul în care s-au împerecheat două tulpini diferite care au format biofilme monomicrobiene dense/puternice, s-a observat că biofilmul polimicrobian a fost de asemenea mai dens. Un exemplu clar a fost în cazul tulpinilor:

Compararea rezistenței microbiene în biofilme cu o singură specie vs. complexe

- **CT8279** (*Escherichia coli*) biofilm monomicrobian dens: 1.37642
- **CO1438** (*Staphylococcus aureus*) biofilm monomicrobian dens: 1.30057

Prin urmare, s-a constatat că biofilmul polimicrobian format de cele două tulpini a fost mai dens/puternic (1.75421), creșterea fiind favorizată și condiționată.

Un alt aspect important de luat în considerare a fost tipul de produs biologic din care au fost recoltate tulpinile bacteriene. Perechile de tulpini care au fost recoltate din același produs biologic au prezentat un biofilm polimicrobian mediu sau crescut.

De exemplu dacă tulpinile bacteriene perechi (*Staphylococcus aureus* + *E. coli*) au fost recoltate din secreție plagă, biofilmul format a fost dens/puternic. În cazul în care au fost crescute două tulpini de bacterii diferite din produse biologice diferite, biofilmul format a fost mediu. De asemenea s-a observat că tulpinile bacteriene perechi (*Staphylococcus aureus* + *E. coli*) recoltate din lichidul cefalorahidian au format biofilm slab, densitatea acestuia fiind condiționată de produsul biologic de proveniență.

În concluzie densitatea biofilmelor polimicrobiene este influențată de tipul de produs biologic din care au fost recoltate tulpinile bacteriene, însă indiferent de sursa biologică creșterea biofilmelor este mult mai puternică în cadrul celor polimicrobiene față de cele monomicrobiene, ceea ce sugerează dezvoltarea condiționată a biofilmelor polimicrobiene (tabel 4).

Tabel 4: Combinația tulpinilor microbiene pentru obținerea de biofilme polimicrobiene

Produs biologic/ Tulpina <i>Staphylococcus aureus</i>	Produs biologic/ Tulpina <i>Escherichia coli</i>	Biofilm polimicrobian
Secreție plagă/ CO1438	Secreție plagă/ CO1453	Puternic
Secreție plagă/ CO1438	Urocultură/ CT9376	Mediu
Secreție plagă/ CO1438	Aspirat bronșic/ CU0181	Mediu
Secreție plagă/ CP8150	Aspirat bronșic/ CU0181	Mediu
Secreție plagă/ CP8150	Lichid cefalorahidian/ CO1165	Mediu
Secreție plagă/ CN7897	Lichid cefalorahidian/ CO1165	Mediu
Secreție plagă/ CO1438	Hemocultură/ CT8279	Mediu
Lichid cefalorahidian/ CN7897	Lichid cefalorahidian/ CO1165	Slab
Secreție plagă/ CN4099	Hemocultură/DK1034	Mediu

Compararea rezistenței microbiene în biofilme cu o singură specie vs. complexe

Secreție plagă/ CN3606	Aspirat bronșic/ CT6950	Mediu
Secreție plagă/ CP7487	Spermoc./CP9286	Mediu
Secreție plagă/ CP7107	Urocultură/ CV1876	Mediu
Secreție plagă/ CL9002	Urocultură/ CO1320	Mediu
Secreție plagă/ CO0587	Urocultură/ CP7921	Mediu
Secreție plagă/ CP8150	Hemocultură/ DM3527	Mediu

3. Terapia antimicrobiană și perspective de viitor

Este important de menționat că marea majoritate a infecțiilor cu biofilme formate de *S. aureus* și *E. coli* prezintă rezistență multiplă la antibioterapie. În general, medicația antimicrobiană nu este eficientă. În cazul formării biofilmelor la nivelul dispozitivelor medicale se recurge la îndepărtarea dispozitivului medical intern iar terapia antimicrobiană este adesea prelungită și are loc în ambulatoriu.

B-lactaminele, fluorochinolonele și aminoglicozidele sunt cele mai folosite antibiotice în tratamentul infecțiilor cu biofilme, desigur doar în cazul în care pacienții nu prezintă rezistență la aceste antibiotice. Dozarea acestor agenți este limitată deoarece ele au o toxicitate ridicată (nefrotoxicitatea aminoglicozidelor). Prin urmare, aminoglicozidele sistemice sunt de obicei recomandate în terapia prelungită numai atunci când este singura variantă și nu se poate administra o altă medicație alternativă la fel de eficientă și mai puțin toxică. Vancomicina este principalul agent utilizat pentru tratamentul infecției cu biofilm rezistent la metilina. Rifampicina are capacitatea de a ucide bacteriile sesile metabolice, este foarte utilă pentru infecțiile biofilmelor de *S. aureus*. În plus, prezintă și biodisponibilitate ridicată și are foarte puține efecte secundare cunoscute. Pentru a preveni apariția rezistenței la rifampină, aceasta trebuie utilizată în combinație cu un alt antibiotic activ împotriva *S. aureus* sau *E. coli*, cum ar fi Vancomicina sau una dintre fluorochinolone.

Totuși utilizarea frecventă a antibioticelor în terapia antimicrobiană, determină instalarea rezistenței microorganismelor la acțiunea acestora, ceea ce necesită utilizarea și descoperirea de noi metode alternative în prevenirea și combaterea proceselor infecțioase produse de acestea.

În prezent se urmărește utilizarea a două metode pentru a combate rezistența microorganismelor formatoare de biofilm la antibiotice: **chimice** și **biologice**. Metoda chimică utilizează biocidele și dezinfectanții care sunt principalele arme folosite în distrugerea biofilmelor. Metoda biologică utilizează produse naturale selectate precum uleiurile esențiale. Acestea conțin amestecuri de numeroase substanțe chimice organice,

Compararea rezistenței microbiene în biofilme cu o singură specie vs. complexe

care au capacitatea de a inhiba creșterea microorganismelor și sunt bine cunoscute pentru activitățile lor antibacteriene.

Bibliografie

1. Brogden K.A., Guthmiller J.M., Taylor C.E (2005). Human polymicrobial infections. *Lancet*. 15-21;365(9455):253-5.
2. Cuesta, A.I., Jewtuchowicz, V., Brusca, M. I., Nastri, M.L., Rosa, A.C. (2010). Prevalence of *Staphylococcus* spp and *Candida* spp in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. *Acta Odontol. Latinoam.*, 23, 1, 20-26.
3. Makovcova J., Babak V., Kulich P., Masek J., Slany M., Cincarova L (2017). Dynamics of mono- and dual-species biofilm formation and interactions between *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria. *Microb Biotechnol*;10(4):819-832.
5. Marshall, K.,C. (1992). Biofilms: a overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. *Am Soc Microbiol News*, 58, p. 202-207.
6. Monds, R.D., O'Toole, G.A. (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review *Trends in Microbiology*. 17, 2, p. 73-87.
7. Nagant, M., Tré-Hardy, M., Devleeschouwer, J.P. Dehaye, D. (2010). Study of the initial phase of biofilm formation using a biofomic approach, *J. Microbiol. Meth.* 82, p. 243-248.
8. Omar Camarillo-Márquez, Itzel M. Córdova-Alcántara, Cesar H. Hernández-Rodríguez, Blanca E. García-Pérez, María A. Martínez-Rivera and Aida V. Rodríguez-Tovar (2018). Antagonistic Interaction of *Staphylococcus aureus* Toward *Candida glabrata* During in vitro Biofilm Formation Is Caused by an Apoptotic Mechanism. *Front. Microbiol.* 9:2031.
9. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54, p.49-79.
10. Shadaba A., Steven M. Opal (2008). Bench-to-bedside review: Quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection, *Critical Care* 2008, 12, 6, p. 236.
11. Shirliff, M.E., Mader, J.T., Campe, A.K. (2002). Molecular Interactions in Biofilms. *Chemistry and Biology*, 9, 8, p. 859-871.
12. Stoodley, P., Boyle, J.,D., Dodds, I., Lappin S.,H.,M. (1997). Consensus model of biofilm structure. In: *Biofilms: community interactions and control*. Third meeting of the British Biofilm Club, Gregynog Hall, Powys, p. 1-9.
13. Sutherland, I.W. (2001) - The biofilm matrix: an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.*, 9, 222-227.