

БИОФИЛМ ОБРАЗУВАНЕ ОТ *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*: ЕТАПИ, УЧАСТИЕ В ПАТОГЕНЕЗАТА НА ИНФЕКЦИИТЕ И ВЪЗМОЖНИ ТЕРАПЕВТИЧНИ ПОДХОДИ

А. Трифонова¹, Е. Савов¹ и Т. Стратева²

¹Лаборатория по микробиология, Катедра „Военна епидемиология и хигиена“, Военномедицинска академия – София

²Катедра по медицинска микробиология, Медицински факултет, Медицински университет – София

BIOFILM FORMATION BY *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*: STAGES, INVOLVEMENT IN THE PATHOGENESIS OF INFECTIONS AND POSSIBLE THERAPEUTIC APPROACHES

A. Trifonova¹, E. Savov¹ and T. Strateva²

¹Laboratory of Microbiology, Department of Military Epidemiology and Hygiene, Military Medical Academy – Sofia

²Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Medical University – Sofia

Резюме. *Stenotrophomonas maltophilia* е опортюнистичен патоген със забележителна резистентност към редица антимикробни лекарствени средства и широко разпространение в околната среда, в това число и болничната. Честотата на причинените от него нозокомиални инфекции нараства значимо през последните години. *S. maltophilia* може да формира биофилми върху биотични и абиотични повърхности – способност, която е пряко свързана с неговата вирулентност. В болнични условия това е проблем в два аспекта – колонизиране на медицински устройства и участие в патогенезата на инфекциите, предизвикани от микроорганизма. По тази причина активно се проучва влиянието на различни антимикробни агенти, включително и в субинхибиращи концентрации, върху образуването на биофилм. Настоящият обзор представя фенотипните характеристики и генетичните механизми при формирането на биофилм от *S. maltophilia*, неговото влияние върху макроорганизма, участие в междуклетъчната сигнализация и възможните терапевтични подходи за отстраняването му.

Ключови думи: *Stenotrophomonas maltophilia*, биофилм/образуване, участие в патогенезата, терапевтични подходи за повлияване

Abstract. *Stenotrophomonas maltophilia* is an opportunistic pathogen with remarkable resistance to a number of antimicrobial drugs and is widespread in the environment, including hospital wards. The frequency of nosocomial infections caused by it has significantly increased over recent years. *S. maltophilia* can form biofilm on both biotic and abiotic surfaces – ability that is directly related to its virulence. In hospital settings this problem has two aspects: colonization of medical devices and involvement in the pathogenesis of infections due to this microorganism. Therefore, the effect of various antimicrobial agents, including sub-inhibitory concentrations, on the biofilm formation is actively studied. This review article presents the phenotypic characteristics and genetic mechanisms of biofilm formation by *S. maltophilia*, its impact on the host, involvement in the cell-to-cell signaling and possible therapeutic approaches for its removal.

Key words: *Stenotrophomonas maltophilia*, biofilm formation, involvement in the pathogenesis, therapeutic approaches for removal

ВЪВЕДЕНИЕ

Stenotrophomonas maltophilia е грам-отрицателен микроорганизъм, принадлежащ към групата на неферментиращите глюкозата бактерии. Той е широко разпространен в околната среда и е опре-

делян като важен опортюнистичен нозокомиален патоген. Понастоящем се отчита повишаване на честотата му на изолиране – предимно от пациенти на изкуствена вентилация в отделенията за интензивни грижи; при имунокомпрометирани болни, както и при страдащите от генетичното заболяване

муковисцидоза [2, 3, 7, 16, 33]. Също така, се отбелязва и разширяване на спектъра на клинични синдроми, асоциирани с инфекциите, причинени от *S. maltophilia*. Най-чести са тези на респираторния тракт, но са регистрирани и уринарни, раневи, очни инфекции, бактериемии, сепсиси, ендокардити, менингити, остеохондрити и перитонити [1, 7, 12]. Основен проблем при лечението им е вродената резистентност на този микроорганизъм към редица антимикробни лекарствени средства (АМЛС), възможността за развитие на придобита резистентност, както и способността му да формира биофилм върху различни абиотични повърхности и тъкани на макроорганизма [13, 30, 34].

Биофилм

Биофилмът е общност от бактериални клетки, свързана с дадена повърхност. Клетките, включени в тази специфична структура, се разполагат в екстрацелуларен матрикс, изграден от полизахариди и протеини. По този начин те придобиват повишена устойчивост към антисептични разтвори, различни АМЛС, както и към действието на имунната защита на макроорганизма [7, 8, 11].

ФОРМИРАНЕ НА БИОФИЛМ ВЪРХУ РАЗЛИЧНИ ПОВЪРХНОСТИ

Установено е, че биофилмите се асоциират с 65% от придобитите в болнични условия инфекции, а в такава среда *S. maltophilia* е описан като контаминант на различни медицински консумативи и оборудване [7, 46]. Той е способен да формира биофилми върху влажни повърхности (при това с повишена резистентност към водоразтворими дезинфектанти), които могат да влязат в пряк или непряк контакт с пациенти. Сред регистрираните подобни източници са дихателни тръби, катетри, абокати, диализна апаратура, зъболекарско оборудване, болнични водопроводни системи (мивки и смесители) и др. [7].

Образуването на биофилм от *S. maltophilia* е изучавано на различни абиотични повърхности – тефлон, стъкло, полистирен, поливинилхлорид и др. Адхезията и последващото му формиране се повлияват както от физикохимичните свойства на бактериалната клетка (напр. наличието на външни мембранни протеини и липополизахариди), така и от повърхността, към която клетките се прикрепват (напр. протезни устройства, покрити с полимери на екстрацелуларния матрикс на макроорганизма, или относително хидрофилно стъкло, или хидрофобен поливинилхлорид) [7]. Проучва-

не на щамове *S. maltophilia*, изолирани от питейна вода, отчита липсваща или слаба адхезия към поливинилхлорид, слаба или умерена адхезия към полиетилен и липса на адхезия към ASI 316 неръждаема стомана. В тази връзка, стои проблемът с конструирането на материали за импланти, които да препятстват бактериалната адхезия, тъй като протезните устройства биват покривани със субстанции на гостоприемника, включително протеини и въглехидрати, улесняващи от своя страна прикрепването на патогена [7, 52]. Установено е, че нивата на продукция на биофилм варират сред клиничните изолати и на тази база те се разделят на 3 групи: силно, средно и слабо продуциращи биофилм [57]. Интересна зависимост е отбелязана при проучването на Passerini de Rossi и сътр., изследвали образуването на биофилм в полистиренови микроплаки, боросиликатни и полипропиленови епруветки, при което всички изследвани щамове *S. maltophilia* са изолирани от пациенти с нозокомиални инфекции, асоциирани с медицински устройства. Те съобщават, че слабите биофилми се визуализират като пръстен от клетки на повърхността на течността, прикрепен към стените на епруветката, докато умерените и силните биофилми изцяло покриват дъното и стените. Същото изследване регистрира способността на силно продуциращ биофилм клиничен изolat *S. maltophilia* да се прикрепва към гумени, силиконови и поливинилхлоридни уретрални катетри. След 24-часова инкубация, бактериалните клетки демонстрират висока степен на адхезивност и към трите тествани материала, като колонизираните повърхности са визуализирани чрез оцветяване с Кристал виолет. В допълнение, при същия бактериален щам е доказана повишена резистентност на оксидативен стрес – един от обичайните защитни механизми на макроорганизма, насочени срещу патогените по време на инфекциозния процес [34].

От критична важност е предотвратяване формирането на биофилми в болнични условия, което определя и проучванията в тази насока. Установено е, че ефективно отстраняване и инхибиране на бактериалния биофилм може да се постигне чрез използване на дезинфектанти, съдържащи няколко активни антимикробни агента, като от съществено значение е пълното изсъхване на обработената повърхност или оборудване (напр. ендоскоп) след дезинфекцията преди следващото им използване [7, 26].

Биофилмите, образувани от *S. maltophilia*, са проучвани и върху биотични повърхности – монос-

лоеве от клетки (клетъчни култури НЕр-2, IB3-1 и др.) и тъкани. В резултат от направените изследвания се налага схващането, че формирането на биофилм върху абиотични повърхности може да се осъществи по начин, различен от наблюдавания върху биотични повърхности – клетъчни монослове, животински модели или пациенти [7, 43].

ЗНАЧЕНИЕ НА БИОФИЛМА ЗА ПАТОГЕНЕЗАТА НА ИНФЕКЦИИТЕ, ПРИЧИНЕНИ ОТ *S. MALTOPHILIA*

Основните фактори, свързани с наличието на биофилм, които повлияват пряко патогенезата, са 2: защитата на бактериите от имунните механизми на макроорганизма и повишаването на антибиотичната резистентност [5, 13]. Бактериалните клетки, включени в биофилм, са трудно податливи на лечение с АМЛС, поради засиления трансфер на маркери на резистентност в тази клетъчна общност вследствие от ограничаване на дифузията в екстрацелуларния матрикс и инактивиране на антибиотичите при висока концентрация на метални йони, ниско рН, както и от микробната персистенция на метаболитно неактивни клетки, които не се влияят от лечението. Заедно тези особености правят бактериите, включени в биофилм, до 1000-пъти по-толерантни и/или резистентни към АМЛС в сравнение със свободните, неангажирани в биофилма клетки, а лечението на инфекциите при вече установен биофилм, често е неуспешно [19, 25]. Прилагането на антимикробни препарати може да облекчи симптомите на тези инфекции, но невъзможността за пълно излекуване превръща биофилмите в резервоар за рецидив на заболяването [9].

Скоростта, с която *S. maltophilia* колонизира полистиренова повърхност (прикрепване след 2 часа инкубация и максимален интензитет на формиране на биофилма след 24 часа на култивиране), подсказва, че при колонизирани медицински устройства, замяната на устройството с ново, може да е неефективна, тъй като свободните клетки могат да се прикрепят към новата повърхност и инфекцията да продължи [13]. Регистрирани са случаи на ендокардит причинен от *S. maltophilia*, вследствие на колонизирани изкуствени сърдечни клапи [6, 23]. Акумулирането на биофилм върху подобни устройства може да доведе до тяхното блокиране или разрушаване, което от своя страна да предизвика намален поток, турбулентност или изпускане. Освободените от тези биофилми бактериални клетки могат лесно да мигрират и да причинят инфекции в други

органи, а части от биофилма, попаднали в кръвообращението, могат да го блокират в терминални точки като мозъка или бъбреците [47].

При имунокомпрометирани пациенти проявите на инфекции, причинени от опортюнистични, образуващи биофилм патогени, могат да са сериозни, водещи до особено тежки симптоми и в нередки случаи до летален изход [25]. При болните от муковисцидоза, колонизиране на белодробните тъкани настъпва приблизително при 1/3 от случаите, макар че мненията относно значимостта на *S. maltophilia*-колонизацията за клиничния изход се различават [17, 41]. Въпреки че патогенните механизми, позволяващи на бактериите да причинят инфекция и колонизация на респираторния тракт, при подобни пациенти са слабо изяснени, счита се, че образуването на биофилм допринася за прогресиране на белодробното заболяване при болните от муковисцидоза, а също и при пациенти с други болести на дихателните пътища, асоциирани с развитие на хронични инфекции [9, 41]. Освен на резистентността, до известна степен това се дължи и на факта, че компонентите на екстрацелуларния матрикс играят роля и на фактори на вирулентност (известно е, че алгинатът може да уврежда белите дробове) [37].

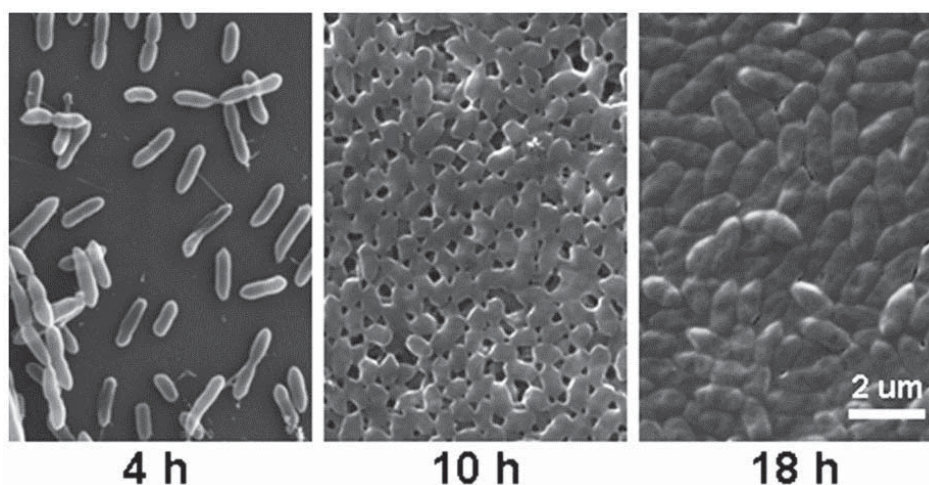
Проучване, извършено с прилагането на конфокална лазерносканираща микроскопия, показва, че изолираните в ранните етапи на хронична инфекция щамове *S. maltophilia*, имат способността да формират по-структуриран и многослоен биофилм в сравнение с тези, от късните фази, които от своя страна са със значително понижена адхезивност и не могат да образуват зрял биофилм. Авторите на изследването приемат, че тази особеност е следствие от адаптирането на *S. maltophilia* към „стресова“ среда, каквато са белите дробове на болни от муковисцидоза или хронична обструктивна белодробна болест [57].

УСЛОВИЯ И ЕТАПИ НА ФОРМИРАНЕТО НА БИОФИЛМ

Условието, при които се постига оптимално образуване на биофилм, са установени лабораторно при клинични изолати *S. maltophilia*. По-голямо количество биофилм се образува при температура на култивиране от 32°C, в сравнение с режимите на 37°C и 18°C; също при аеробни условия и в атмосфера с 6% CO₂, спрямо анаеробно култивиране. Доказано е, че изолатите произвеждат сходни количества биофилм при рН 8.5 и рН 7.5, но по-големи от тези, произведени при рН 5.5 [7, 14].

Формирането и растежът на биофилма се ръководят от редица физични, химични и биологични процеси. Разграничават се няколко последователни етапа. Първият от тях е първоначалното обратимо прикрепване на свободните клетки посредством физични сили или бактериални структури, като видът на повърхността, температурата, рН и налягането могат да повлияят в голяма степен адхезията. Следващият етап на формиране на биофилм е необратимото прикрепване на клетките към повърхността и размножаването им до формиране на микроколонии, около които се натрупва полимерният матрикс [19, 25]. И в двете ранни фази е подчертана ролята на пилите и флагелите. Значението на фимбриалните структури за образуването на биофилм е доказано убедително чрез използването на антитела срещу т.нар. SMF-1 фимбрии (*S. maltophilia* fimbriae 1). Тези антитела оказват инхибиращ ефект върху адхезията към клетъчен монослой и формирането на биофилм от щамове *S. maltophilia* [11]. Авторите на друго проучване изказват предположението, че т.нар. тип IV пили могат да действат като биофилм-адхезини качествено, независимо от тяхната функционалност, тъй като не е открита статистически значима корелация между подвижността, медирана от тях както с адхезията, така и с образуването на биофилм [45]. Също така е установено, че в адхезията на клинични изолати *S. maltophilia* към трахеална лигавица от мишки вземат пряко участие флагелите, а белтъкът флагелин, от който те са изградени, играе роля на адхезин. Предполага се, че именно чрез флагелите, формираните биофилми се прикрепват към мукуса

на лигавиците [56]. Следва етап на зреене, който се характеризира с промени в генната експресия, водещи до синтез на екстрацелуларни полимерни субстанции (EPS), необходими за стабилизиране на биофилма, а също и осъществяване на динамични процеси на междуклетъчна комуникация. Увеличава се броят на слоевете и съответно дебелината на биофилма. В рамките на зрелия биофилм, общността от клетки активно обменя и споделя продукти, поддържащи неговата архитектура и осигуряващи благоприятна среда за включените бактерии [25]. Динамиката на формирането на биофилм от *S. maltophilia* върху полистиренова повърхност се наблюдава чрез сканираща електронна микроскопия. След 4-часово култивиране, бактериалните клетки са прикрепени към повърхността и заемат приблизително 30% от нея. След 10 часа почти цялата повърхност е покрита с клетки, с малки пространства между тях, като започва секрецията на EPS. На 18-ия час полистиреновата повърхност е покрита изцяло със зрял биофилм (фиг. 1) [54]. Последна е фазата на дисперсия (разпръсване), която може да настъпи поради много и различни причини като: недостиг на нутриенти, натрупване на токсични продукти, интензивна конкуренция, изчерпване на популацията и др. Различни ензими дестабилизируют структурата на биофилма и подпомагат откъсването на бактериалните клетки от матрикса. Дисперсията може да възникне в целия биофилм или в част от него, а свободните бактерии са способни да инициират процеса на образуване на нов биофилм, попадайки в подходяща среда [25, 47].



Фиг. 1. Динамика в образуването на биофилм от щам *S. maltophilia* от бронхиално дърво след 4- (ляво), 10- (средата) и 18-часово (дясно) култивиране върху полистиренови плаки – сканираща електронна микрография (по Wang et al., 2016)

ГЕНЕТИЧНИ МЕХАНИЗМИ, АСОЦИИРАНИ С ОБРАЗУВАНЕТО НА БИОФИЛМ

Тясна връзка с формирането на биофилм при *S. maltophilia* има експресията на 3 гена: *spgM*, *rmlA* и *rpfF* (табл. 1). Те не повлияват неговото количество, тъй като сигнификантни мутации в *spgM* и *rmlA* са открити и при силно, и при слабо продуциращите биофилм щамове, но самото образуване на биофилма корелира в значителна степен с наличието и на 3-те гена при изследваните клинични изолати. Ролята на *spgM*, *rmlA* и *rpfF* все още търпи изясняване, кои мутации в ключови аминокиселини определят функционални промени в протеините и като цяло изменения във формирането на биофилм [57]. Генът *spgM* кодира бифункционален ензим с фосфоглюкомутаза и фосфоманомутаза активност. Фосфоглюкомутазата се асоциира с биосинтеза на липополизахарид (ЛПЗ) и алгинат, като в изследване на McKay и сътр. е установено, че мутантни щамове с липсващ *spgM* продуцират по-малко ЛПЗ в сравнение с родителския щам (*SpgM*⁺) и проявяват тенденция за по-къси О-полизахардни вериги. Въпреки че не са констатирани явни изменения в химичния състав на ЛПЗ в резултат на загубата на *spgM*, мутантните щамове показват леко увеличаване на чувствителността към някои антимикробни агенти, напълно авирулентни са при животински модел на инфекция и са убивани бързо от човешки серум [29].

Мутации в *rmlA* причиняват изменения в ЛПЗ, водещи до промени във флагелите и тип IV пилите, а те от своя страна се отразяват на подвижността, прикрепването и формирането на биофилм [20]. Друго проучване, сравняващо изолати *S. maltophilia* от пациенти със и без муковисцидоза, намира, че наличието на *spgM*, *rmlA* или *rpfF* не засяга значително средното количество био-

филм, образуван и от двата вида клинични изолати, но въпреки това, разглеждайки популацията като цяло, наличието на *rmlA* съществено увеличава формирането на биофилм [43]. При щам *S. maltophilia* WR-C, изолиран от септична система, е доказано че генът *rmlA*, заедно с *rmlC* и *xanB* участва в ЛПЗ/ЕПЗ свързания биосинтетичен път. ЕПЗ е екзополisahарид, основен компонент на екстрацелуларната полимерна субстанция [20].

Синтезът на дифузионен сигнализиращ фактор (DSF) е напълно зависим от гена *rpfF*, част от *rpf* клъстер. Мутантни щамове *S. maltophilia* с инактивиран *rpfF*, освен че губят способността да синтезират DSF, имат силно намалена подвижност, изменени ЛПЗ профили и понижена способност за образуване на биофилм, както и по-слаба продукция на извънклетъчни протеази и повишена чувствителност към определени антибиотици и тежки метали. DSF молекулите участват в т.нар. "cell-to-cell" сигнализация между отделните бактериални клетки (quorum sensing – QS). По този начин се осъществяват процесите на комуникация между клетките, които позволяват на популацията да синхронизират своята генна експресия при достигането на критична клетъчна плътност. DSF сигнализацията при *S. maltophilia* играе роля и при регулацията на множество функции, допринасящи за нарастване на антибиотичната резистентност и вирулентността на този микроорганизъм [15, 21].

QS системата е жизненоважен регулаторен механизъм, който се основава на продукцията, детекцията и отговор на извънклетъчните сигнални молекули, наречени автоиндуктори (в случая DSF). Автоиндукторите се натрупват в средата, когато нараства бактериалната плътност на популацията. При достигане на висока локална концентрация на автоиндуктора, клетките отчитат информацията за промяна в техния брой и популацията

Таблица 1. Гени, асоциирани с образуването на биофилми при *S. maltophilia*

Ген	Продукт	Функция	Литературен източник
<i>spgM</i>	Ензим с фосфоглюкомутаза и фосфоманомутаза активност	Участие в синтеза на ЛПЗ, сглобяване на полизахаридната верига на О-антигена	McKay et al., 2003
<i>rmlA</i>	Глюкозо-1-фосфат тимидилтрансфераза	Участие в ЛПЗ/ЕПЗ свързания биосинтетичен път	Huang et al., 2006
<i>rpfF</i>	DSF синтаза	Участие в синтеза на DSF (медиатор на междуклетъчната сигнализация)	Fouhy et al., 2007 Huedo et al., 2015

ЛПЗ – липополизахарид, ЕПЗ – екзополisahарид, DSF – дифузионен сигнализиращ фактор

отговаря чрез координирана експресия на специфични таргетни гени [4]. QS медиатора също и междувидова сигнализация, доказана между *S. maltophilia* и други микроорганизми (*Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*) [36, 49].

ВЛИЯНИЕ НА АНТИМИКРОБНИ АГЕНТИ ВЪРХУ БИОФИЛМА

При формирането на зрелия биофилм се натрупва екстрацелуларна полимерна субстанция и хранителни и кислородни градиенти, влияещи върху клетъчния метаболизъм и скоростта на растеж. Това от своя страна води до намаляване на навлизането и активността на антимикробните агенти, а патогените постепенно стават по-устойчиви към тях [25]. Отправна точка и важен фактор за ефективно изкореняване на повечето хронични инфекции, основаващи се на наличието на биофилм, е неговата фаза на развитие. При избор на подходящо АМЛС често се разчита на резултати от конвенционални методи за чувствителност, при които се изследва свободната клетъчна фракция. Провеждането на тестове за антимикробна чувствителност на самия биофилм може да предостави ефективно напътствие за подходящо лечение на хронични инфекции, причинени от *S. maltophilia* [55]. Понастоящем взаимодействието на антимикробни агенти и биофилми на *S. maltophilia* е активно проучвано – изследвани са ефектите на някои антибиотици (включително и в субинхибиращи концентрации) върху адхезията на клетките към повърхности, върху образуването на биофилм и при различни етапи от неговото развитие [7, 51].

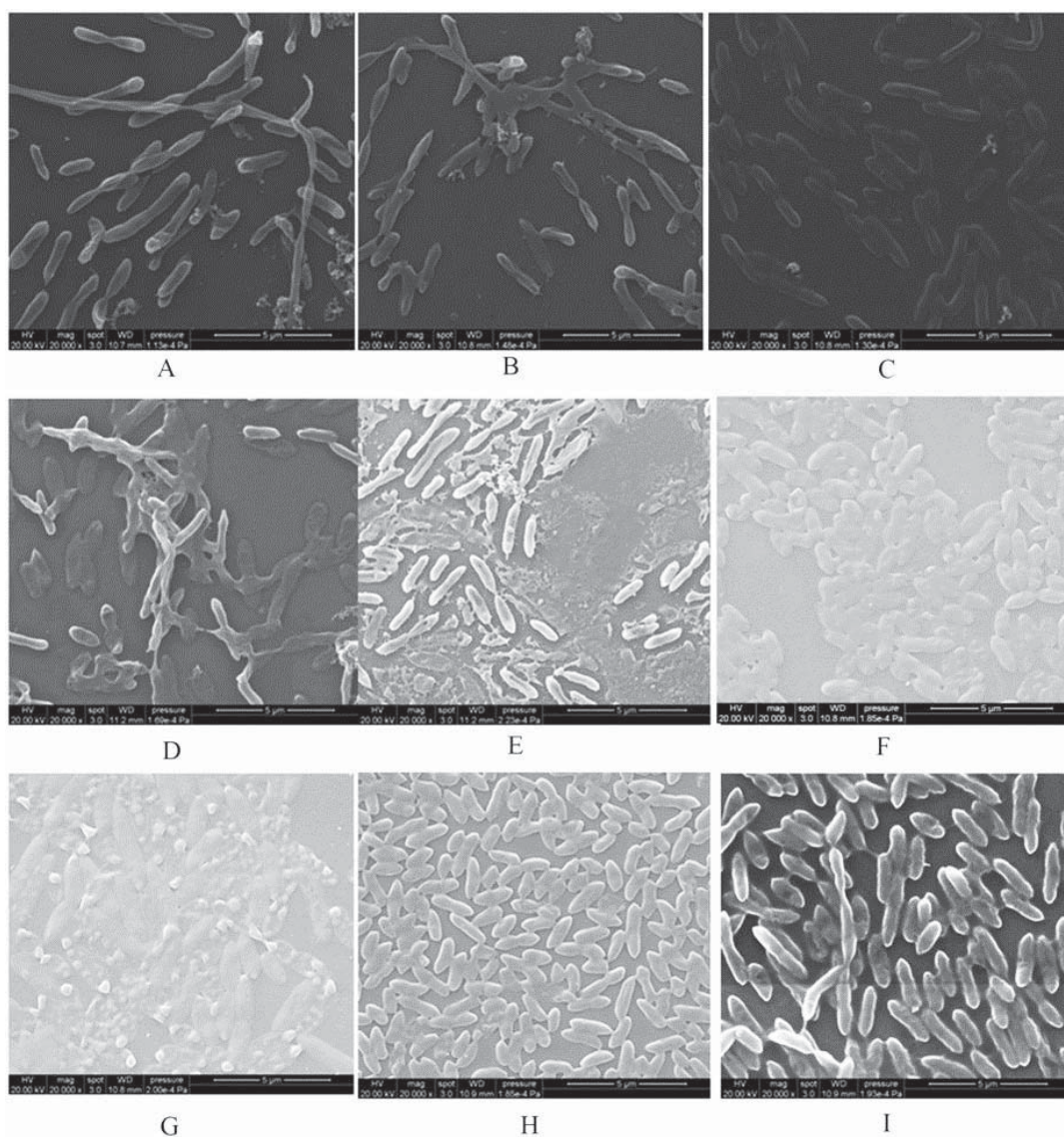
Изследване на 125 щамове *S. maltophilia*, изолирани от храчки и бонхоалвеоларен лаваж (БАЛ) от пациенти с муковисцидоза, сравнява чувствителността на свободни клетки и на клетки под формата на биофилм към действието на 9 различни антибиотика поотделно и в двойни комбинации [55]. Значително по-малко изолати показват чувствителност към флуорохинолони, colistin, tobramycin, doxycycline, trimethoprim-sulfamethoxazole и β -лактами, когато са под формата на биофилм, в сравнение с резултатите, получени от изследване на свободните клетки. Само половината от изолатите са чувствителни на trimethoprim-sulfamethoxazole (считан за средство на избор при лечението на инфекции, причинени от *S. maltophilia*), когато е прилаган конвенционал-

но при тестване на свободни клетки, като по-малко от 10% са чувствителни под формата на биофилм. Повечето изолати са чувствителни на colistin и в двете форми на проучване – свободни клетки и биофилм, а най-ефективните двойни комбинации са включващите colistin. Не е ясно обаче, могат ли да бъдат постигнати достатъчни концентрации от този антибиотик в белия дроб *in vivo* при инфекции, причинени от *S. maltophilia*, в сравнение с тези, демонстрирани *in vitro*. Според това изследване, най-ефективно и при двете форми на растеж е използването на levofloxacin, за който и други автори съобщават, че може да доведе до деструкция на формираните от *S. maltophilia* биофилми и значително да редуцира масата им [35, 55].

Друго проучване върху 20 клинични изолата *S. maltophilia*, продуциращи биофилм върху полистиренови плаки, демонстрира, че всички тестовани флуорохинолони (ciprofloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin, ofloxacin и rifloxacin) ефективно редуцират масата на биофилма при приложение на 1/2 от минималната потискаща концентрация (МПК), а също и при 1/4 от МПК (с изключение на levofloxacin) [13]. Moxifloxacin е показал най-силен ефект за предотвратяване на адхезията. Всички тестовани флуорохинолони (с изключение на norfloxacin) редуцират биомасата на биофилма и отново moxifloxacin показва най-голяма активност в това отношение – 500 $\mu\text{g/ml}$ премахва биомасата при 50% от изолатите и я редуцира до 95% при 60% от тях. Анализ на клетъчната жизнеспособност във вече образуван биофилм, третиран с антибиотици, разкрива че rifloxacin е най-ефективен, като редуцира броя на бактериални клетки до 0.6%, 5.4% и 17.1% при концентрации респективно от 500, 100 и 50 $\mu\text{g/ml}$. Установено е също, че третиране с rifloxacin на 18-часови биофилми, образувани от *S. maltophilia* върху полистирен, предизвиква ултраструктурни изменения в бактериалните клетки. Авторите на проучването достигат до извода, че rifloxacin е способен да проникне в тези биофилми с щамовоспецифична ефективност, вероятно поради химичната и физичната хетерогенност на биофилмите, образувани от *S. maltophilia*. Ceftazidime не е ефективен върху вече формиран биофилм за премахването му, а при прилагане на trimethoprim-sulfamethoxazole са необходими високи концентрации (500 $\mu\text{g/ml}$) за редуциране на биомасата на биофилма [7, 13].

Проучване на Wang и сътр. също потвърждава ефекта *in vitro* на флуорохинолоните (moxifloxacin, levofloxacin и ciprofloxacin) за намаляване биомасата на биофилми, продуцирани от щамове *S. maltophilia*, като се съобщава за по-добър инхибиращ ефект върху формирането на биофилм на концентрации moxifloxacin дори по-ниски от използваните в предходното изследване (10 µg/ml проявяват по-добър инхибиращ ефект върху формирането на биофилм от 100 µg/ml, но без разлика в ефектите в сравнение с концентрация 50 µg/ml). Инхибиращият ефект на концентрации от 10 µg/ml levofloxacin или ciprofloxacin е по-слабо изразен, отколкото този при по-високи концен-

трации. При трите изследвани флуорохинолона в 3 различни концентрации (10, 50 и 100 µg/ml) се отбелязва по-силен инхибиращ ефект, когато са приложени на формираните, но незрели биофилми (след 4 или 10 часа инкубация), и значително по-слаб – при зрели биофилми (след 18 часа инкубация) (фиг. 2). Авторите обясняват факта с различията в пропускливостта за антибиотици на биофилма в ранните и късните (зрели) етапи на развитие – хетерогенност, асоциирана с клетъчния растеж, QS-системите и други механизми. Ето защо, ранното идентифициране и лечение на причинителите на инфекции е от значение за контрол на образуването на биофилм [54].



Фиг 2. Биофилми, формираны от щам *S. maltophilia*, при третиране с moxifloxacin за 4 ч (А–С), 10 часа (D–F) и 18 часа (G–I) при концентрации 10 µg/ml (A, D, G), 50 µg/ml (B, E, H) и 100 µg/ml – сканираща електронна микрография. Увеличение: x 20 000 (Wang et al., 2016)

Субинхибиращи концентрации тоxифлохасин са тествани и срещу щамове *S. maltophilia*, изолирани от пациенти с муковисцидоза, които не са лекувани с този антибиотик [42]. Установено е, че суб-МПК редуцират адхезията на щамове към полистирен и потискат образуването на биофилм. Този антибиотик повлиява хидрофобността на клетъчната повърхност на *S. maltophilia*, която е важен фактор за адхезията и формирането на биофилм, но авторите на изследването доказват, че това е щамово-зависим феномен и по тази причина отделните щамове трябва да бъдат тествани, за да се определи ефективността на тоxифлохасин при всеки от тях. СЕМ микрографии не са показали ултраструктурни изменения в бактериалните клетки под действието на суб-МПК от този антибиотик. Проучването предполага, че клинично постижими концентрации тоxифлохасин ефективно ще инхибират адхезията и формирането на биофилм от *S. maltophilia*, но е необходима проверка на тази хипотеза при животински модел на инфекция [7, 42].

Нови терапевтични подходи

Понастоящем в търсене на бързо действащи и ефикасни методи за лечение са разработвани някои нови стратегии, основаващи се на убиване на бактериалните клетки или блокиране на специфични механизми на биофилма [25]. Подобна бактерицидна стратегия е фаговата терапия, явяваща се обещаваща алтернатива на конвенционалните АМЛС [53]. Описани са голям брой бактериофаги, с тесен или широк кръг гостоприемници, които инфектират *S. maltophilia* и имат потенциал да бъдат използвани за лечение (DLP1, DLP2, DLP6, Smp 131, phiSMA5 и др.) [27, 38, 39].

Друга възможност за терапия на биофилм-асоциирани инфекции предоставят сребърните наночастици. Установено е, че те инхибират бактериални биофилми във висока степен (над 95%) както *in vitro*, така и *in vivo*, като при тази форма бива избегната потенциалната токсичност на среброто за макроорганизма [22, 50]. Предполага се, че тяхната биоцидна ефективност се дължи на комбинация от малкия им размер (до 100 nm) и високото съотношение на повърхност към обем, които позволяват тясно взаимодействие с микробните мембрани [25, 31].

Антимикробните пептиди са съединения, които се произвеждат от имунната система на макроорганизма (част от вродения имунитет) и са

предложени като атрактивна възможност за разработването на нови антибиотици. Техните спектър и механизъм на действие все още се нуждаят от дефиниране, преди да бъдат признати за терапевтична стратегия [25]. Кателицидините са един от най-важните класове антимикуробни пептиди. В проучване на действието им върху щамове *P. aeruginosa* и *S. maltophilia*, изолирани от пациенти с муковисцидоза, се отбелязва, че SMAP-29, VMAP-28 и VMAP-27 значително намаляват образуването на биофилм и убиват бактериалните клетки във вече формиран биофилм [44].

Другият вид стратегии са насочени срещу различните етапи от образуването и развитието на биофилма. Към тях спадат антиадхезионните агенти. Редица проучвания са фокусирани върху предотвратяване прикрепването на бактериалните клетки. Усилията са съсредоточени към разработване на съединения, които да възпрепятсват сглобяването или адхезионните свойства на фимбриалните структури [10, 40].

Нови възможности за терапия предоставя и откритието, че някои бактериални ЕПЗ инхибират или дестабилизираят образуването на биофилм от други видове. Повечето от тези небиоцидни полизахариди са с широк спектър на биофилм-инхибиране, а някои от тях са способни да разрушават формираните биофилми. Счита се, че свойствата им се дължат на тяхната способност да изменят физичните характеристики на бактериалните клетки или абиотичните повърхности; да действат като молекулни сигнали, повлияващи генната експресия на възприемчивите бактерии; конкурентно да инхибират многовалентните въглеводород-протеинови взаимодействия, които опосредстват адхезията [25, 48].

Лечение и превенция на биофилм-свързани инфекции е предложено и чрез потискане на системите за сигнална трансдукция, чрез които бактериалните клетки възприемат и отговарят на промените в околната среда. Смуцването на тази сигнализация не убива бактериите, а *депрограмира* оптималната генна експресия и отнема вирулентността, без да осъществява селективен натиск за поява на резистентност [18, 32].

Действието на т.нар. *антиматриксни агенти* се основава на възпрепятстване натрупването на бактериални клетки чрез разрушаване на компонентите на екстрацелуларния матрикс. За целта се проучва използването на инхибиращи ензими, които повлияват синтеза или модификацията на

компоненти на EPS и други съставки на матрикса. В същото направление са предложени и хелатните агенти – освен, че нарушават стабилността на бактериалните мембрани, те могат да дестабилизируют архитектурата на биофилма [25].

Поради факта, че невключените в биофилм бактериални клетки са по-податливи на лечение, е предложена нова терапевтична стратегия, действаща чрез манипулиране на естествените сигнали, произведени от бактриите, за стимулиране на дисперсията. В тази връзка е проучван ефектът на биоинженерни протеини и D-аминокиселини [24, 28]. Такава терапия би била успешна, когато сигнализацията се комбинира с въвеждане на АМЛС, които да убият освободените бактерии [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

До момента терапевтичните подходи за предотвратяване образуването на биофилми са ограничени и този факт, заедно с присъщата резистентност на бактериалните клетки, включени в биофилм, към антибиотични и бактерицидни агенти, го определят като заплаха за общественото здраве. Откриването на по-ефективни начини за разрушаване на биофилмите е наложителна. Въпреки че днес някои нови методи за лечение са в развитие (фагова терапия, сребърни наночастици, антимикробни пептиди, антиадхезионни и „антиматриксни“ агенти и др.), необходими са още бъдещи изследвания за по-доброто разбиране на механизмите на формиране и динамиката на биофилма при *S. maltophilia*, за да бъдат разработени стратегии за неговия контрол.

Библиография

1. Божкова М, Стоева Т, Божкова К. Въртеболнични инфекции, причинени от *Stenotrophomonas maltophilia*. Медицински преглед, 2015, 51(4), 12-18.
2. Петрова Г, Стратева Т, Переновска П. Етиологичната структура на инфекциите на долните дихателни пътища при пациенти с муковисцидоза. In Spiro, 2011, 3(15), 40-43.
3. Трифонова А, Савов Е. *Stenotrophomonas maltophilia* – нозокомиален патоген с нарастваща значимост. Военна медицина, 2015, 1-2, 28-33.
4. AboZahra R. Quorum sensing and interspecies interactions in *Stenotrophomonas maltophilia*. Brit. Microbiol. Res. J., 2013, 3(3), 414-422.
5. Adegoke AA, Stenström TA, Olkoh AI. *Stenotrophomonas maltophilia* as an emerging ubiquitous pathogen: Looking beyond contemporary antibiotic therapy. Front. Microbiol., 2017, 8, 2276, doi: 10.3389/fmicb.2017.02276.
6. Bayle S, Rovey C, Sbragia P et al. *Stenotrophomonas maltophilia* prosthetic valve endocarditis: a case report. J. Med. Case Reports, 2008, 2, 174.
7. Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. Clin. Microbiol. Rev., 2012, 25(1), 2-41.
8. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE et al. Microbial biofilms. Ann. Rev. Microbiol., 1995, 49, 711-745.
9. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 1999, 284(5418), 1318-1322.
10. Cusumano CK, Pinkner JS, Han Z et al. Treatment and prevention of urinary tract infection with orally active FimH inhibitors. Sci. Transl. Med., 2011, 3(109), 109ra115.
11. de Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M et al. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. Cell Microbiol., 2003, 5(9), 625-636.
12. Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. Clin. Microbiol. Rev., 1998, 11(1), 57-80.
13. Di Bonaventura G, Spedicato I, D'Antonio D et al. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: Modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. Antimicrob. Agents Chemother., 2004, 48(1), 151-160.
14. Di Bonaventura G, Stepanović S, Picciani C et al. Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. Folia Microbiol., 2007, 52(1), 86-90.
15. Fouhy Y, Scanlon K, Schouest K et al. Diffusible signal factor-dependent cell-cell signaling and virulence in the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. J. Bacteriol., 2007, 189(13), 4964-4968.
16. Fujita J, Yamadori I, Xu G et al. Clinical features of *Stenotrophomonas maltophilia* pneumonia in immunocompromised patients. Respir. Med., 1996, 90(1), 35-38.
17. Goss CH, Mayer-Hamblett N, Aitken ML et al. Association between *Stenotrophomonas maltophilia* and lung function in cystic fibrosis. Thorax, 2004, 59(11), 955-959.
18. Gotoh Y, Eguchi Y, Watanabe T et al. Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria. Curr. Opin. Microbiol., 2010, 13(2), 232-239.
19. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int. J. Antimicrob. Agents., 2010, 35(4), 322-332.
20. Huang TP, Somers EB, Wong ACL. Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. J. Bacteriol., 2006, 188(8), 3116-3120.
21. Huedo P, Yero D, Martinez-Servat S et al. Decoding the genetic and functional diversity of the DSF quorum-sensing system in *Stenotrophomonas maltophilia*. Front. Microbiol., 2015, 6: 761.
22. Kalishwaral K, BarathManiKanth S, Pandian SR et al. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. Colloids Surf. B. Biointerfaces, 2010, 79(2), 340-344.
23. Katayama T, Tsuruya Y, Ishikawa S. *Stenotrophomonas maltophilia* endocarditis of prosthetic mitral valve. Intern. Med., 2010, 49(16), 1775-1777.
24. Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S et al. D-amino acids trigger biofilm disassembly. Science, 2010, 328(5978), 627-629.
25. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. Cold Spring Harb. Perspect. Med., 2013, 3(4), a010306.

26. Kovaleva J, Degener JE, van der Mei HC. Mimicking disinfection and drying of biofilms in contaminated endoscopes. *J. Hosp. Infect.*, 2010, 76(4), 345-350.
27. Lee CN, Tseng TT, Chang HC et al. Genomic sequence of temperate phage Smp 131 of *Stenotrophomonas maltophilia* that has similar prophages in xanthomonads. *BMC Microbiol.*, 2014, 14:17.
28. Ma Q, Yang Z, Pu M et al. Engineering a novel c-di-GMP-binding protein for biofilm dispersal. *Environ. Microbiol.*, 2011, 13(3), 631-642.
29. McKay GA, Woods DE, MacDonald KL et al. Role of phosphoglucomutase of *Stenotrophomonas maltophilia* in lipopolysaccharide biosynthesis, virulence, and antibiotic resistance. *Infect. Immun.*, 2003, 71(6), 3068-3075.
30. Mihaylova SA, Sredkova MP, Svensson LA et al. Emergence of clinical strains of *Stenotrophomonas maltophilia* resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole in a Bulgarian university hospital. *J. Biomed. Clin. Res.*, 2008, 1(1), 18-25.
31. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 2005, 16(10), 2346-2353.
32. Njoroge J, Sperandio V. Jamming bacterial communication: New approaches for the treatment of infectious diseases. *EMBO Mol. Med.*, 2009, 1(4), 201-210.
33. Nseir S, Di Pompeo C, Brisson H et al. Intensive care unit-acquired *Stenotrophomonas maltophilia*: incidence, risk factors, and outcome. *Crit. Care.*, 2006, 10(5), R143.
34. Passerini de Rossi B, Calenda M, Vay C et al. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* from device-associated nosocomial infections. *Rev. Argent. Microbiol.*, 2007, 39(4), 204-212.
35. Passerini de Rossi B, Garcia C, Calenda M et al. Activity of levofloxacin and ciprofloxacin on biofilms and planktonic cells of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with device-associated infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2009, 34(3), 260-264.
36. Passerini de Rossi B, Garcia C, Alcaraz E et al. *Stenotrophomonas maltophilia* interferes via the DSF-mediated quorum sensing system with *Candida albicans* filamentation and its planktonic and biofilm modes of growth. *Re. Argent. Microbiol.*, 2014, 46(4), 288-297.
37. Pedersen SS, Hoiby N, Espersen F et al. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax*, 1992, 47(1), 6-13.
38. Peters DL, Linch KH, Stothard P et al. The isolation and characterization of two *Stenotrophomonas maltophilia* bacteriophages capable of cross-taxonomic order infectivity. *BMC Genomics*, 2015, 16:664.
39. Peters DL, Stothard P, Dennis JJ. The isolation and characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* T4-like bacteriophage DLP6. *PLoS ONE*, 2017, 12:e0173341.
40. Pinkner JS, Remaut H, Buelens F et al. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006, 103(47), 17897-17902.
41. Pompilio A, Crocetta V, Confalone P et al. Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol.*, 2010a, 10(102).
42. Pompilio A, Catavittello C, Picciani C et al. Subinhibitory concentrations of moxifloxacin decrease adhesion and biofilm formation of *Stenotrophomonas maltophilia* from cystic fibrosis. *J. Med. Microbiol.*, 2010b, 59, 76-81.
43. Pompilio A, Pomponio S, Crocetta V et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: Genome diversity, biofilm formation, and virulence. *BMC Microbiol.*, 2011a, 11: 159.
44. Pompilio A, Scocchi M, Pomponio S et al. Antibacterial and anti-biofilm effects of cathelicidin peptides against pathogens isolated from cystic fibrosis patients. *Peptides*, 2011b, 32(9), 1807-1814.
45. Pompilio A, Piccolomini R, Picciani C et al. Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2008, 287(1), 41-47.
46. Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science*, 1999, 283(5409), 1837-1839.
47. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem.*, 2015, 7(4), 493-512.
48. Rendueles O, Kaplan JB, Ghigo JM. Antibiofilm polysaccharides. *Environ. Microbiol.*, 2013, 15(2), 334-346.
49. Ryan RP, Fouhy Y, Garcia BF et al. Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*, 2008, 68(1), 75-86.
50. Secinti KD, Özalp H, Attar A et al. Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. *J. Clin. Neurosci.*, 2011, 18(3), 391-395.
51. Stoitsova SR., Paunova-Krasteva TS, Borisova DB. Modulation of biofilm growth by sub-inhibitory amounts of antibacterial substances. *Immunology and Microbiology, "Microbial Biofilms – Importance and Applications"*, book edited by Dharumadurai Dhanasekaran and Nooruddin. Published: July 13, 2016.
52. Simões LC, Simões M, Oliveira R et al. Potential of the adhesion of bacteria isolated from drinking water to materials. *J. Basic. Microbiol.*, 2007, 47(2), 174-183.
53. Trifonova A, Todorova I, Savov E. Bacteriophage therapy. *Probl. Inf. Parasit. Dis.*, 2016, 44(2), 46-50.
54. Wang A, Wang Q, Kudinha T et al. Effect of fluoroquinolones and azithromycin on biofilm formation of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 29701.
55. Wu K, Yau YCW, Matukas L et al. Biofilm compared to conventional antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, 57(3), 1546-1548.
56. Zgair AK, Chhibber S. Adhesion of *Stenotrophomonas maltophilia* to mouse tracheal mucus is mediated through flagella. *J. Med. Microbiol.*, 2011, 60(7), 1032-1037.
57. Zhuo C, Zhao QY, Xiao SN. The impact of spgM, rpfF, rmlA gene distribution on biofilm formation in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS One*, 2014, 9(10), e108409.

✉ Адрес за кореспонденция:

д-р Ангелина Трифонова
Лаборатория по микробиология
Катедра „Военна епидемиология и хигиена“
Военномедицинска академия
ул. „Св. Георги Софийски“ № 3
1606 София
e-mail: angelina3fonova@abv.bg