

BIOFILMUL PNEUMOCOCIC

șef lucrări dr. *Oana Falup-Pecurariu*¹, dr. *Ioan Ovidiu Pecurariu*²,
dr. *Cristina Popa*³, asist.univ. dr. *Cristian Falup-Pecurariu*¹

¹Universitatea „Transilvania” din Brașov, Facultatea de Medicină

²Cabinet Medical Individual

³Spitalul Clinic de Copii Brașov

Abstract:

Bio films represent a complex state between eu- and prokaryotes. High resistance towards antibiotics along with chronic and recurrent otitis media due to pneumococcus determined the extension of research regarding carriage and so to the bio film description.

These bio films are the key of understanding of the management of pneumococcal infections in the future.

Keywords: pneumococcus, bio film, carriage.

Introducere

S. pneumoniae este un anaerob Gram pozitiv facultativ care, cel mai adesea, coloni-zează nazofaringele omului sănătos. Coloniza-rea nazofaringiană în absența oricărui semn de boală asigură pneumococului un mediu de viață extrem de stabil care îi va permite și transmi-terea la o altă gazdă. Modelul de purtător va permite dezvoltarea unor factori de persistență care sunt diferiți însă de cei de virulență [9].

Paradigma biofilmului pneumococic a fost recent pusă în discuție întrucât uneori este dificil de tratat otita cu antibiotice, mai ales atunci când aceasta este recurentă și cronică.

Peste 60% dintre infecțiile acute bacte-riene și până la 80% dintre cele cronice bacte-riene se consideră a se datora biofilmelor [23].

Pneumococul colonizează nazofaringele copiilor de sub 5 ani în proporție de până la 100% și poate determina, în anumite condiții, pneumonie, otită, meningită și septicemie.

Particularitățile clinice și biochimice ale mucoasei nazale

Cavitatea nazală are niște particularități anatomice și funcționale unice. Este subiectul unor modificări de pH, de osmolaritate și în aportul de nutrienți. Este o zonă bine ventilată, având o temperatură de 34°C fiind considerată o zonă mai rece față de alte zone ale corpului [11]. Valorile de pH sunt de la 6,4 la 6,9, 82 la 91 mM Na⁺ și 82 la 108 mM de Cl⁻ precum și 3.9 la 5.8mM de glucoză [10].

Experimentele efectuate au demonstrat că orice modificări ale acestor parametri vor

determină modificări ale structurii biofilmelor pneumococice.

Biofilmul - definiție și caracteristici

Biofilmele reprezintă populații de micro-organisme care aderă la o suprafață și sunt învelite de o matrice extracelulară alcătuită în principal din exopolizaharide uneori legate de proteine și de ADN [13]. Natura prezintă aceste biofilme, adesea multispecific, și creează fenoti-puri diferite ca și ritm de creștere, dar și ca ex-presie genică [17]. Biofilmele au subminat gra-nița biologică între eucariote și procariote [7].

Acestor biofilme le datorăm persistența portajului dar și rezistența la antibiotice precum și la mecanismele de apărare ale organismului.

Biofilmele sunt, „per se”, o strategie de supraviețuire simplă, prin care pneumococului i se oferă șansa de a supraviețui într-un mediu protejat, dar ele sunt și un rezervor de bacterii.

Primele biofilme au fost descrise în secolul al XIX-lea în plăcile dentare, mai apoi fibroza chistică a oferit modele de biofilme viabile, cu caracteristici de status sesil alcătuint comunități celulare, spre deosebire de cele planctonice, care nu aderau la suprafață [2,8].

Pneumococii au beneficiat apoi de descrierea biofilmelor care sunt reglate printr-un mecanism numit „quorum sensing” (QS). QS este de fapt promotorul formării de biofilme și este dovedit că el va prelua din mediu de 10 ori mai mult ADN decât contrapartenerul său care trăiește în condiții libere [26]. Inducerea de semnale de către QS CSP promovează biofil-mele in vitro, iar celulele pneumococice, care sunt extrase din acestea, au un grad înalt de

virulență pentru pneumonie dar și pentru meningită [15]. Celulele planctonice testate pe modelele animale au fost mult mai apte să determine apariția de sepsis. Toate aceste studii converg, prin aceea că este necesar ca în cursul infecției organismului gazdă pneumococul să existe în două variante. Confirmarea a venit de la vizualizarea pe țesut a unui astfel de biofilm [15].

Aceste sisteme permit „discuțiile” inter-specii, iar prin semnale regulatorii externe permit modularea internă a peretelui bacterian pentru exprimarea unor gene care vor permite adaptarea de la starea sesilă la cea planctonică [29, 30].

Colonizarea și portajul bacterian sunt considerați pentru pneumococ factori de virulență [29].

Capsula pneumococică este considerată a fi un factor major de virulență. Exprimarea capsulei pare a interfera cu formarea de biofilm dar și cu dezvoltarea de biofilme care selectează variante neîncapsulate de pneumococi [2,21]. *S. pneumoniae* mai este cunoscut și pentru faptul că are o capsulă care variază din punct de vedere fenotipic la momentul aderării de celule epiteliale [14].

Arhitectura biofilmului pneumococic

Pneumococului îi sunt necesare aproximativ 6 zile pentru a forma biofilme. În anul 1997 s-a reușit crearea și vizualizarea unui biofilm de pneumococ în filtre de celuloză [3]. Pe suprafețe abiotice pneumococul neîncapsulat produce structuri tridimensionale, unele de 25 μm adâncime observate la scanarea microscopică dar și la scanarea la temperatură joasă cu microscopie electronică [22]. Foarte recent s-au observat și structuri în fagure de miere [28].

Exprimarea dezvoltării biofilmului la serotipul 3 are diferite stagii, de la inițiala atașare cu apariția de mici colonii la 1 zi de la însămânțare, în ziua a 2 a apar colonii care au dimensiunea de 20 μm în înălțime și în grosime, iar din ziua a 3-a biofilmul este complet structurat cu celule care se suprapun peste coloniile deja create [9, 19].

S. pneumoniae, din punct de vedere arhitectural, este caracterizat de o vastă și extinsă rețea diversă fenotipic, dar și genotipic, așa cum este demonstrată de abilitatea de a produce 90 de serotipuri distincte de capsulă polizaharidică [16, 33]. Toate serotipurile pneumococice sunt capabile de a forma biofilme care diferă din

punct de vedere al dimensiunilor coloniilor, ale biomasei și ale înălțimii biofilmului.

Sunt descrise trei tipuri de arhitectură a biofilmului. Grupul I este alcătuit din biofilme înalt structurate cu microcolonii mari care posedă canale de apă. Dimensiunile acestora variază între 40 până la 150 μm în diametru și de la 90 la 150 μm în înălțime. Acestea sunt specifice lanțurilor ATCC 6303, BS71, BS72, CHPB. Cel de al II-lea grup, care este alcătuit din biofilmele *S. pneumoniae* cu lanțurile BS68, BS69, BS70 și BS73 și BS74 care sunt mai puțin bine organizate, nu atât de mari, dar care și ele posedă canale de apă. Înălțimea și lățimea lor este însă incomparabil mai mică. Grupul III este produs de lanțurile CHPA, CHPC, F3114, W2938 și de către BS75 au o structură relativ plată și mult mai puțină biomasă. Acest grup de biofilme este aparent mai granular datorită prezenței unor foarte mici colonii celulare cu dimensiuni de sub 20 μm , dar și datorită dispersiei microcoloniile care nu depășesc în diametru 20 μm [1]. Aceste diferențe în structura biofilmelor nu se datorează ratei de creștere care a fost similară în cele trei grupe, ci se datorează altor factori.

Diferența dintre grupele de biofilme studiate a fost dată de biomasa acestora pentru care se utilizează programe speciale. Grupul I are cea mai mare biomasă dar și maximum de grosime. Celui de al II-lea grup îi scade biomasa, lucru demonstrabil prin microcoloniile distincte și mult mai mici față de primul grup. Pentru grupul III biomasa este cea mai mică, dar și asprimea suprafeței acesteia este cea mai mică comparativ cu primele două grupuri. Procesul formării biofilmelor este unul extrem de complex al trecerii de la formă planctonică la una complexă atașată de suprafață.

Dezvoltarea structurilor proteomice în biofilm

Formarea biofilmelor se corelează cu modificări extensive proteomice care pot fi studiate prin spectrometrie de masă determinată de amprenta proteică. 30% dintre proteoamele studiate la 3 zile au fost diferite față de modelul planctonic, 14% supraexprimate și 18% subexprimate. În plus, 200 de proteine au fost sintetizate de novo. După 6 și, respectiv, 9 zile de stimulare 40% din structura proteomului a fost găsită a fi modificată având 20% dintre proteine

supraexprimate, iar după 9 zile 60 de proteine erau sintetizate de novo. Ceea ce este interesant este că numai 54% dintre proteine sunt produse în mod constant [1]. Această diferență de producție este rezultatul adaptării bacteriei la condițiile de viață de suprafață și nu rezultatul vreunei încălcări proteice.

Mai multe proteine sunt produse diferit în cursul formării biofilmului. Proteinele responsabile de metabolism respectiv de biosinteză sunt NAD specifice precum și glucozo 6 fosfat izomerază, dar și fosfoglicerat kinază, care sunt mai abundente în timpul fazei planctonice.

Proteinele implicate în procesul de translație sunt de tipul ribozomal 30S respectiv 50S.

O singură proteină este implicată în producția capsulară de UDP glucozo dehidrogenază.

Există o mare cantitate de proteine care sunt implicate în virulență, dar și în rezistență. Foarte recent s-a dovedit că în colonizarea pneumococică capsula joacă un rol important.

Toate studiile au demonstrat că exprimarea capsulei polizaharidice este esențială pentru serotipurile 2 și 3 [28]. Exprimarea marcată a UDP glucozo dehidrogenazei, care este implicată în producția capsulară, demonstrează rolul capsulei în virulență dar și atașare. Serotipurile 3 și 23 determină mai multă inflamație decât serotipurile 1, 5, 9 și 7F [31].

Pe modelele animale au fost detectate biofilme, dar și în tuburile copiilor cu otite cronice [27]. In vivo, formarea biofilmelor este strâns legată de formarea capcanelor de neutrofile [33].

Prezența atât a ADN-ului extracelular cât și a anumitor proteine, s-a demonstrat că influențează formarea biofilmului pentru pneumococ.

Importanța capsulei polizaharidice și a colinelor

În cazul portajului, pneumococul adoptă o stare sesilă, care îi va asigura supraviețuirea pe termen lung [13]. Bacteria pare a urma un program de liză și de moarte celulară dependentă de orientarea spațială a biofilmului [34].

Totodată, pentru pneumococ, atât celulele competente cât și cele non competente vor interveni în formarea de agregate în anumite condiții, iar capacitatea de agregare este determinată de eliberarea de ADN în mediu.

Fratricidele sunt reprezentate de către enzimele LytA sau LytC [30]. CbpA și PcpA sunt colinele importante pentru colonizarea nazofaringiană [12,20], care, abia recent s-a dovedit că ar avea un rol în formarea de biofilm. *srtA* este o genă care codează 23 de proteine cu rol de ancorare a *S. pneumoniae* [32]. Mutanții acestei gene sunt deficienți în atașarea de celulele epiteliale pe modelele experimentale. Aceste studii au dus la concluzia recentă, capsula polizaharidică este aptă să mascheze posibilitățile noastre de identificare a biofilmelor pneumococice.

Este posibil ca o parte din genele necesare formării de biofilme in vitro să fie extrem de importante pentru colonizarea in vivo.

69 de gene mutante au fost depistate a fi importante pentru colonizare, dar și pentru formarea de biofilme. Diferite serotipuri de pneumococ sunt apte să producă biofilme în curgere, dar și static [5]. Biofilmele sunt mai vizibile și se formează mai bine în absența capsulei [18].

Capsula polizaharidică ajută pneumococul să scape de mucusul care acoperă mucoasa, permițând astfel bacteriei să ajungă la nivelul stratului epitelial, unde poate să înceapă dezvoltarea acesteia [14].

Odată ce a străbătut mucoasa, capsula pierde din importanță în ceea ce privește persistența pneumococului. Izolatele din colonizarea nazofaringiană exprimă cantități mai mici de capsulă față de cele sălbatice [28], iar pacienții cu otită medie au nivele și mai mici.

Colinele se pare că mediază aderarea la celulele gazdă prin interacțiunea cu activator plachetar uman. Proteinele ligante de colină vor determina ancorarea colinelor reziduale de acizii teihoici. Un minim de polizaharid capsular este absolut necesar colonizării nazofaringiene la modelele animale [3,4]. Down reglarea producției de capsulă pare a stimula legarea și atașarea de celula gazdă și permite invazia nazofaringelui uman [35]. Mai recent s-a demonstrat că și lanțurile noncapsulare sunt apte să determine colonizare dar au o durată și o densitate mult reduse [24].

Patogenii sunt obligați să determine boală la organismul gazdă, astfel încât să reușească să se transmită la un alt organism. Așadar, aceștia trebuie să aibă și factori de virulență, nu numai factori care să îi asigure supraviețuirea. Organismele comensale care nu

afectează gazda în timpul unui ciclu de viață nu au factori de virulență de la început. *S. pneumoniae* este un comensal care colonizează cel mai adesea nazofaringele la un mare număr de indivizi sănătoși care rămân asimptomatici. Pentru *S. Pneumoniae*, unii dintre așa-zii factori de virulență nu se găsesc o presiune de selecție, iar dintre cei necesari colonizării unii se vor pierde rapid modificând profund structura bacteriei. *S. pneumoniae* este o bacterie care are o remarcabilă plasticitate [6]. Pneumolizina a fost supraexprimată în formarea biofilmului. Sistemul QS pare a juca un rol esențial în ceea ce privește colonizarea și persistența colonizării.

LuxS este una dintre proteinele necesare biosintezei AI-2 care apare la o multitudine de specii bacteriene. Deși această genă este vitală pentru colonizare, ea este mult mai puțin capabilă să determine invazie la nivelul plămânilor sau sângelui [25].

Biofilmul și-a făcut loc recent în gândirea medicală, odată cu constatarea faptului că, deși aparent steril, lichidul din secreția otică era pozitiv la PCR pentru ADN-ul bacterian.

Elementul fundamental a fost demonstrarea faptului că la PCR apărea și ARN bacterian din lichidul de la nivelul urechii medii [20,16]. ARN-ul mesager are viață extrem de scurtă, iar prezența lui demonstrează o bacterie vie și activă din punct de vedere metabolic.

Impactul co-infecției virale și bacteriene

Există o acțiune combinată a *S. pneumoniae* împreună cu virusurile cu tropism respirator care, împreună, crează aceste agregate bacteriene. Infecțiile recurente, studiate la peste 24 de milioane de pacienți din SUA diagnosticați anual cu otită, au dus la concluzia că toți au fost tratați cu antibiotice. Modelele animale la care s-a inoculat *S. pneumoniae* au dezvoltat otita medie în proporție de 70% în prezența virusului gripal. Dacă s-a administrat o enzimă litică cpl-1 înainte de a provoca inflamația urechii medii în prezența virusului gripal aceasta previne formarea de biofilm.

Concluzii

1. Biofilmul bacterian este o realitate și unei bacterii într-un mediu propice îi trebuie numai câteva minute pentru a realiza un biofilm.

2. Biofilmul pneumococic posedă o rețea arhitecturală complexă, care îi permite supraviețuirea.

3. Proteinele din structura biofilmului se vor modifica permițând adaptarea bacteriei la condițiile de viață.

Bibliografie:

1. Allegrucci M., Hu F.Z., Shen K. et al. - Phenotypic characterization of *S. pneumoniae* biofilm development, *J Bacteriol*, 2006, 2325-2335.
2. Allegrucci M., Sauer K. - Characterization of colony morphology variants isolated from *S. Pneumoniae* biofilms. *J Bacteriol*, 2007, 189(5): 2030-2038.
3. Bayles K. W. - The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5: 721-726.
4. Bogaert D., de Groot R., Hermans P. W. M. - *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. *Lancet Inf Dis*, 2004, 4: 144-154.
5. Budhani R. K., Struthers J. K. - The use of Sorbarod biofilms to study the antimicrobial susceptibility of a strain of *Streptococcus pneumoniae* *J Antimicrob Chemother*, 1997, 40: 601-602.
6. Claverys J. P., Prudhomme M., Mortier Barriere I. - Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination mediated genetic plasticity, *Mol Microbiol*, 2000, 35: 251-259.
7. Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E. et al. - Microbial films, *Annu Rev Microbiol*, 1995, 49: 711-745.
8. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. - Bacterial biofilms a common cause of persistent infections, *Science* 1999; 284: 1318-1322.
9. Engelhard D., Pomeranz S., Gallily N. et al. - Serotype related differences in inflammatory response to *S. pneumoniae* in experimental meningitis, *J Infect Dis*, 1997, 175: 979-982.
10. Exley R. M., Goodwin L., Mowe E. et al. - *Neisseria meningitidis* lactate permease is required for nasopharyngeal colonization, *Infect Immun*, 2005, 73: 5762-5766.
11. Ferrera I., Sanchez O., Mas J. - Characterization of a sulfide oxidizing biofilm deve-

- loped in a packed column reactor, *Int Microbiol*, 2007, 10: 29-37.
12. Fischer W. - Phosphocholine of pneumococcal teichoic acids: role in bacterial physiology and pneumococcal infection, *Res Microbiol*, 2000, 151: 421-427.
 13. Hall Stoodley L., Stoodley P. - Evolving concepts in biofilm infections, *Cell Microbiol Infect Immun*, 2009, 73: 4653-4667.
 14. Hammerschmidt S., Wolff S., Hocke A. et al. - Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells, *Infect Immun*, 2005, 73(8): 4653-4667.
 15. Havarstein L.S., Martin B., Johnsborg O. et al. - New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol Microbiol*, 2006, 59: 1297-1337.
 16. Henrichsen J. - Six newly recognized types of *S. pneumoniae*. *J Clin Microbiol*, 1995, 33: 2759-2762.
 17. Keck T., Leiacker R., Riechelmann H. et al. - Temperature profile in the nasal cavity. *Laryngoscope*. 2000, 110: 651-654.
 18. Kim J.O., Weiser J.N. - Association of intrastain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *S. pneumoniae*. *J Infect Dis*, 1998, 177: 368-377.
 19. Lopez R., Garcia E. - Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol Rev*, 2004, 28: 553-580.
 20. Magee A.D., Yother J. - Requirement for capsule in colonization by *S. pneumoniae*. *Infect Immun*, 2001, 69: 3755-3761.
 21. McEllistrem M.C., Ransford J.V., Khan S.A. - Characterization of the in vitro biofilm associated pneumococcal phase variants of a clinically relevant serotype 3 clone. *J Clin Microb*, 2007, 45(1): 97-101.
 22. Moscoso M., Garcia E., Lopez R. - Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J Bacteriol*, 2006, 188: 7785-7795.
 23. Moscoso M., Garcia E., Lopez R. - Pneumococcal biofilms. *Internat Microbiol*, 2009, 12: 77-85.
 24. Nelson A.L., Roche A.M., Gould J.M. et al. - Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus mediated clearance. *Infect Immun*, 2007, 75: 83-90.
 25. Oggioni M.R., Trappetti C, Kadioglu A. et al. - Switch from planktonic to sessile life: a major event in pneumococcal pathogenesis. *Mol Microbiol*, 2006, 61: 1196-1210.
 26. Rayner M.G., Zhang Y., Gorry M.C. et al. - Evidence of bacterial metabolic activity in culture negative otitis media with effusion. *JAMA*, 1998, 279: 296-299.
 27. Reid S.D., Hong W., Dew K.E. et al. - *Streptococcus pneumoniae* forms surface attached communities in the middle ear of experimentally infected chinchillas. *J Infect Dis*, 2009, 199: 786-794.
 28. Schaudinn C., Stoodley P., Kainovic A. et al. - Bacterial biofilms, other structures seen as mainstream concepts. *Microb*, 2007, 2: 231-237.
 29. Schauder S., Shokat K., Surette M.G. et al. - The LuxS family of bacterial autoinducers :biosynthesis of a novel quorum sensing signal molecule. *Mol Microbiol*, 2001, 41: 463-476.
 30. Suntharalingam P., Cvitkovitch D.G. - Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. *Trends Microbiol*, 2005, 13: 3-6.
 31. Tauber M.G., Burroughs U., Niemoller M. et al. - Differences in pathophysiology in experimental meningitis caused by three strains of *S. pneumoniae*. *J Infect Dis*, 1991, 163: S11-14.
 32. Tettelin H., Nelson K.E, Paulsen T et al. - Complete genome sequence of a virulent isolate of *S. pneumoniae*. *Science*, 2001, 293: 498-506.
 33. Urban C.F., Lourido S., Zychlinsky A. - How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol*, 2006; 8: 1687-1696.
 34. Wagner V., Iglewski B. - *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis infection. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2008, 35: 124-134.
 35. Weiser J.N. - Mechanism of carriage. In Tuomanen E., Mitchell T.J., Morrison D.A. and Pratt B.G. (ed) *The pneumococcus* ASM Press, 2004, Washington D.C.: 169-182.