

Bakteriers samspel kan vara en nyckel till framtidens antibiotika

JESSICA LÖNN-STENSRUD, Ph D, postdoktor, Instituttt för oral biologi, det odontologiske fakultet
jessiclo@odont.uio.no
TORE BENNECHE, dr philos, professor, Kjemisk institutt, det

matematisk-naturvitenskapelige fakultet
ANNE AAMDAL SCHEIE, dr odont, professor, Instituttt för oral biologi, det odontologiske fakultet; samtlige Universitetet i Oslo

Bakterier har visat sig vara mer avancerade än man tidigare trott. De kan skapa små komplicerade samhällen av bakterier som har olika funktioner, och samarbetet sker genom att de kommunicerar med varandra. Nu finns det förhoppningar om att detta kan användas i framtida behandling av bakteriella infektioner.

Ledprotesoperation och risker

Ledproteskirurgins utveckling har gett många patienter ökad livskvalitet, och ledproteskirurgi är i dag en utbredd verksamhet i svensk sjukvård. Enligt Svenska höftprotesregistret (SHPR) utfördes ca 17 500 höftledsoperationer under 2009, varav ca 1 800 var reoperationer. Som reoperation räknas alla typer av kirurgiska ingrepp som kan relateras till en insatt höftprotes. Andelen reoperationer i förhållande till antalet primäroperationer har legat på 13,5–15,8 procent under de senaste tio åren. Under de senaste tre åren har antalet primäroperationer ökat, vilket betyder att antalet reoperationer också har ökat i samma utsträckning [1].

I de flesta fall går insättningen av proteserna bra. Vid några tillfällen kan det dock uppstå problem som leder till att man måste byta ut proteserna, avlägsna den helt eller göra andra större ingrepp för att säkerställa protesens funktion. Anledningen till att operationer måste göras om är många. Enligt Svenska höftprotesregistret är den vanligaste orsaken aseptisk lossning. Sedan 2005 har infektioner varit den näst vanligaste orsaken till reoperation. Trenden visar också att risken att drabbas av infektion ökar med antal reoperationer [1].

Tidigare studier har identifierat flera riskfaktorer vad gäller protesrelaterade infektioner: reoperation, långtidsanvändning av urinkateter, malnutrition, gikt, diabetes, kraftig övervikt och användning av immunsuppressiva läkemedel. Reoperation räknas som en av de största riskfaktorerna. Vid en primäroperation är risken för infektion ca 1 procent, men vid reoperation kan risken öka till över 20 procent [2].

Biofilm och infektioner

Vad är det då som gör infektioner i samband med implantat så svåra att behandla? Man ansåg länge att bakterier lever planktoniskt, dvs fritt flytande, utan samspel med vare sig andra bakterier eller omgivande miljö. Under de senaste 30 åren har man dock sett att vissa bakterier föredrar att leva i biofilmer. Man har också upptäckt att bakterier faktiskt kan kommunicera med varandra och med sin omgivning [3]. En biofilm kan beskrivas som ett samhälle uppbyggt av bakterier som adhererar till en yta där bakterierna samarbetar och har olika funktioner. Biofilmer finns överallt i fuktiga ekosystem: na-

turen, industrin, människokroppen och sjukvården [4]. En biofilms livscykel antas vara en välreglerad process, som startar med att bakterier adhererar till en yta [5].

På en implantatyta kan både humana celler och bakterier fästa. Vilken som hinner först beror på material, ytstruktur och anatomisk struktur närmast ytan. Vinner de humana cellerna blir ytan ockuperad av celler som då försvarar den och gör den mindre tillgänglig för bakteriell kolonisering. Bakteriernas överlevnadsstrategi bygger på att kunna kolonisera implantatyten eller omgivande vävnad eller ben. Bakteriernas adhesiner, polysackaridpolymerer och andra molekyler från ytan och miljön interagerar för att bygga upp en biofilm bestående av bla bakterier, glykoproteiner, polysackarider och DNA [6].

Stafylokocker är vanligt förekommande bakterier i infektioner i samband med implantat. Stafylokocker har också speciellt god förmåga att kunna fästa direkt på en plastyta. Man är dock inte säker på om detta är viktigt vid infektioner i samband med implantat. Direkt efter insättning av ett implantat täcks implantatyten av humana matrixproteiner, som fibrinogen och fibronectin. Mest sannolikt är att interaktioner mellan de humana matrixproteinerna och de specifika adhesionsmolekyler som stafylokocker uttrycker leder till att bakterierna koloniserar implantatets yta [7]. Därefter ökar antalet bakterier, vilket leder till att ytan blir koloniserad. Samtidigt kan nya bakterier komma och koadherera till de bakterier som redan har fäst sig för att tillsammans bilda en mogen biofilm.

Cykeln avslutas med att enstaka bakterier eller flak av biofilm lossnar för att kunna kolonisera nya ytor. Bildandet av en biofilm är en dynamisk process, där adhesion, koadhesion och tillväxt kan ske vid överlappande tidpunkter. Vilken meka-

»En biofilm kan beskrivas som ett samhälle uppbyggt av bakterier som adhererar till en yta där bakterierna samarbetar och har olika funktioner.«

■ sammanfattat

I många miljöer föredrar bakterier att leva i biofilmer. Biofilmer kan vara en skyddande barriär mot patogena bakterier i människokroppen, men de kan också leda till stora problem och svårbehandlade infektioner i samband med implantat och andra artificiella ytor i kroppen. Bakterier i biofilm är skyddade och därmed mer motståndskraftiga mot antibiotika

och immunförsvaret. De utvecklar även oftare multiresistens mot antibiotika än fritt flytande bakterier. Bakterierna kan bygga upp biofilmer genom att kommunicera med varandra och med den omgivande miljön. Möjligheten att rubba bakteriernas kommunikation kan leda till nya behandlingsmetoder av infektioner i samband med implantat.

nism som dominerar uppbyggnaden av biofilmen är beroende av vilken eller vilka bakterier som är inblandade, vilken typ av yta som koloniserar och de fysiska och kemiska förhållandena som råder i omgivningen [5].

När den ekologiska balansen rubbas

Kroppsytor kan täckas av olika kombinationer av bakterier som lever i ett ekologiskt ekvilibrium. I ett kommensalt ekosystem av denna typ kan bakterierna fungera som ett skydd för människan. Men om balansen ändras kan t ex en speciell bakterieart börja dominera eller en patogen bakterie etablera sig, och detta kan då leda till infektioner. Därför kan även små förändringar ha väsentlig effekt på de inneboende bakterierna [8, 9]. Man har påvisat ett nära förhållande mellan biofilmer och infektionssjukdomar vid användning av medicinska implantat [10].

Plast- och metallytor som används inom proteskirurgin utgör en utmärkt yta för bakterierna att adherera till. Kolonisering av implantatytan sker antingen perioperativt, hematogent eller via bakterier från en annan infektion. Det finns ingen standardiserad beskrivning av ledprotesinfektioner, men de delas oftast in i tidig, försenad eller sen infektion efter när de första symtomen på infektion observeras. Tidig infektion uppstår oftast perioperativt, i samband med operation eller inom 2–4 dagar och orsakas ofta av mycket virulenta bakterier som *Staphylococcus aureus* eller gramnegativa bakterier. Infektionerna som uppstår efter 3–24 månader är också oftast orsakade av bakterier som koloniserar implantatytan perioperativt men orsakas då av mindre virulenta bakterier, som koagulasnegativa stafylokocker, t ex *Staphylococcus epidermidis* eller *Propionibacterium acnes*. Sena infektioner orsakas oftast av hematogen spridning av bakterier från avlägsna infektioner [2, 11].

Bakterier i biofilm skyddade på flera sätt

Bakterier som växer i biofilm skiljer sig på flera punkter från motsvarande fritt flytande bakterier. Detta är viktigt att ta hänsyn till vid både diagnostik och behandling av infektioner. I biofilmen befinner sig bakterierna tätt intill varandra i aggregat som är omringade av en egenproducerad matrix, bestående av polysackarider, proteiner och DNA som härstammar från bakterierna.

Man har sett att bakterier i biofilm kan vara 100–1000 gånger mer motståndskraftiga mot antibiotika än planktoniska varianter [12]. Skälen till detta är flera. Man har observerat att syrekoncentrationen kan vara hög vid biofilmens yta men låg i mitten av biofilmen, där anaeroba förhållanden kan råda. På samma sätt är växt, proteinsyntes och metabol aktivitet skiktade i en biofilm, och man finner en hög aktivitetsnivå vid ytan och långsam eller ingen växt i mitten. Dessutom är mutationsfrekvensen markant högre hos bakterier i biofilmer, vilket leder till en mer effektiv horisontal genöverföring. Detta kan vara en förklaring till varför bakterier i biofilmer ofta blir multiresistenta mot antibiotika som betalaktamer, aminoglykosider och fluorokinoloner. Bakterier som växer i biofilmer är därför skyddade på flera sätt [13].

S epidermidis, S aureus och implantat

S epidermidis är en kommensal bakterie som finns i hudens normalflora och som länge ansågs ofarlig. Men i och med utvecklingen av medicinska implantat har *S epidermidis* blivit en viktig opportunistisk patogen. Tillsammans med *S aureus* är *S epidermidis* den bakterie som oftast isoleras från infektioner associerade med ledproteskirurgi, och i flera studier räknas *S epidermidis* som den vanligaste orsaken till ledpro-

»... i flera studier räknas *S epidermidis* som den vanligaste orsaken till ledprotesinfektioner.»

tesinfektioner [14]. Infektioner i samband med implantat kan också orsakas av att implantatet inte integreras eller av att skador uppstår på implantatytan. Då kan de lämpliga miljöförhållandena för opportunistiska bakterier etableras och leda till sekundär infektion.

Implantatets material är en annan viktig faktor. Interaktioner mellan implantat och bakterier eller humana celler beror till stor grad på implantatytan, atomär struktur nära ytan och implantatets sammansättning. *S epidermidis* adhererar i högre grad till polymerer, medan *S aureus* i högre grad adhererar till metall. När det gäller polymerer är det mycket som tyder på att bakterieinteraktionen med ytan är specifik och att interaktionen beror på vilken typ av polymer det handlar om och hur den har framställts. Därför är också kunskap om och valet av implantatmaterial viktigt [6].

Bakteriers kommunikation

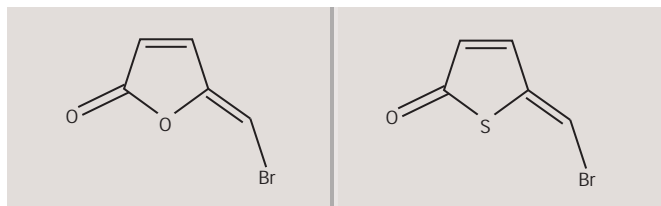
En relativt ny upptäckt är att bakterier kommunicerar med varandra och med den omgivande miljön [15]. De kommunicerar bla för att reglera de gener som styr biofilmutveckling och andra virulensfaktorer. Kommunikationen bygger på bakteriernas förmåga att producera, frigge och upptäcka signalmolekyler i sin närmiljö. Man har också observerat att bakterier kan ta upp signalmolekyler och därigenom minska koncentrationen i närmiljön. Det leder till att bakterier kan »gömma sig« för andra eller lura dem att tro att det inte finns andra arter i närheten. Denna möjlighet kan kanske användas för att förhindra att bakterier bygger upp biofilmer [16].

Upptäckten av biofilmshämmare

Algen *Delisea pulchra* som lever utanför Australiens kust har utvecklat ett system som gör att den undviker kolonisering av marina bakterier. Detta system består av produktion av furanoner i små vesiklar på algens stam med en speciell transportmekanism som gör att furanonerna transporteras ut till alla ytor, där de sedan skyddar algen mot bakterier. Vidare undersökningar har visat att furanon skyddar algen mot bakteriernas biofilm och att den biofilmsreducerande effekten troligtvis beror på rubbningar i den nödvändiga kommunikationen mellan bakterierna [17].

Denna upptäckt ledde till att furanon som behandling mot biofilmer fick stor uppmärksamhet. Bland annat såg man in vitro att furanon reducerade biofilm av *S epidermidis* med 89 procent på polystyrentäckta ytor och med 78 procent på furanontäckta katetrar. En annan in vitro-studie på *P aeruginosa* visade att biofilmer i närvaro av furanon var mer sensitiva för tobramycin och att uttrycket av virulensfaktorer som kontrolleras av kommunikation blev hämmat. Vidare har in vivo-försök gjorts på får och mus. Där visade man att furanon kunde kontrollera *S epidermidis*-infektioner i upp till 65 dagar hos får. Hos mus visade man att furanon påskyndar avlägsnandet av *P aeruginosa* i lungor samtidigt som den reducerar lungsjukdomens allvarlighet och ger ökad överlevnad. Man har också sett att furanon som transporterades till lungor hos mus hämmade det kommunikationsreglerade genuttrycket [17].

Furanon har också in vitro visat sig ha en biofilmsreducerande effekt på *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius* och *Streptococcus mutans*. I samma studie såg



Figur 1. Till vänster: (Z)-5-(bromometylen)furan-2(5H)-on. Till höger: (Z)-5-(bromometylen)tiofen-2(5H)-on.

man också att den biofilmsreducerande effekten av furanon kunde upphävas genom att addera en syntetisk signalmolekyl till bakteriernas växtmedium [18]. Även i en senare studie av furanons biofilmsreducerande effekt på *S epidermidis* såg man att denna kunde upphävas genom att addera en syntetisk signalmolekyl till bakteriernas växtmedium [19].

Trots att furanoner har god biofilmsreducerande effekt så finns det fortfarande bakterier kvar på ytan, även med furanon närvarande. I ett försök att öka effekten har varianter av den ursprungliga strukturen syntetiserats. En variant är att byta ut syreatomen i kolvätningen mot en svavelatom till en tiofenon (Figur 1).

I en ny studie jämfördes effekten av en furanon och en tiofenon på *S epidermidis* biofilm. Både furanon och tiofenon hade en biofilmsreducerande effekt på 75 respektive 90 procent utan att bakterieväxten påverkades (Figur 2). Man observerade också att effekten av furanon och tiofenon kunde upphävas av en syntetisk signalmolekyl, vilket indikerade att reduktionen kunde ha ett samband med rubbad kommunikation. Man såg också att effekten hos bägge molekylerna kunde rubba kommunikationen hos en marin bakterie genom att mäta ljus producerat som svar på bakteriekommunikation [20].

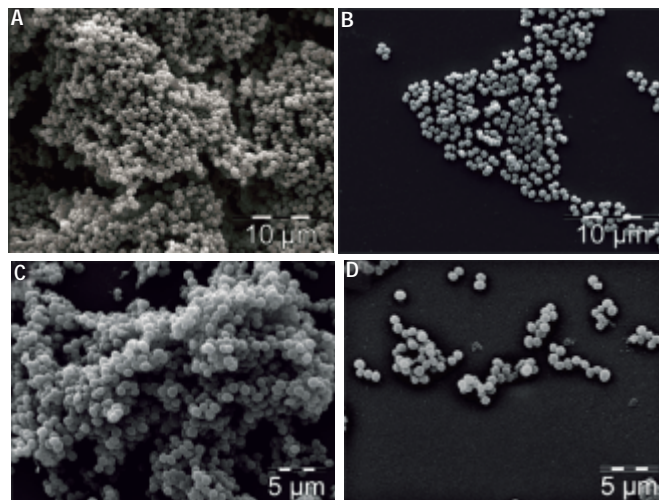
Konklusion

Sammanfattningsvis verkar det som om bakteriekommunikation kan vara en angreppspunkt för att behandla infektioner. Det bästa alternativet skulle vara att finna en molekyl som klarar av att hålla ytor helt rena, men fram till nu har inga molekyler varit så effektiva. Ett alternativ är att använda kommunikationsrubbande molekyler tillsammans med antibiotika för att behandla infektioner orsakade av bakterier som lever i biofilmer.

Ett problem med de molekyler som studerats fram till nu är

REFERENSER

- Garellick G, Kärrholm J, Rogmark C, Herberts P. Svenska höftprotesregistret. Årsrapport 2009. Göteborg: Avdelningen för ortopedi, Sahlgrenska universitetssjukhuset; 2010.
- Esposito S, Leone S. Prosthetic joint infections: microbiology, diagnosis, management and prevention. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32(4):287-93.
- Lopez D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(7):a000398.
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am*. 1978;238(1):86-95.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56:187-209.
- Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science*. 1987;237(4822):1588-95.
- Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:207-28.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49:711-45.
- Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*. 2003;149(Pt 2):279-94.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):167-93.
- Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly*. 2005;135(17-18):243-51.
- Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res*. 1997;11(1):160-7.



Figur 2. Elektronmikroskopiska bilder av *S epidermidis* biofilm på kontrollyta (A, C), på furanontäckt yta (B) och på tiofenontäckt yta (D) [20].

att de i många fall är toxiska för humana celler. Det kan leda till reducerad osseointegration och vävnadsintegration av implantat. Det är därför intressant att man har kunnat observera att med små strukturella förändringar kan man öka det terapeutiska fönstret för tiofenoner så att de kan förhindra bakterier från att fästa sig samtidigt som humana celler förblir opåverkade.

Med tanke på den snabba utvecklingen av resistens mot antibiotika behövs alternativ till dagens antibiotika. Framför allt är det viktigt att bakterier i biofilm läggs till grund i sökandet efter nya antibiotika eller andra nyskapande sätt att behandla infektioner. Att använda molekyler som förhindrar bakterier att fästa sig på implantatets yta är en möjlighet. Forskningen på det området är än så länge bara på en preklinisk nivå. Klinisk utprovning blir aktuell först när man har identifierat de lämpligaste molekylerna.

■ *Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.*

Kommentera denna artikel på Lakartidningen.se

- Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(4):322-32.
- Fey PD, Olson ME. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol*. 2010;5(6):917-33.
- Bassler BL. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*. 1999;2(6):582-7.
- Federle MJ. Autoinducer-2-based chemical communication in bacteria: complexities of interspecies signaling. *Contrib Microbiol*. 2009;16:18-32.
- de Nys R, Givskov M, Kumar N, Kjelleberg S, Steinberg PD. Furanones. *Prog Mol Subcell Biol*. 2006;42:55-86.
- Lönn-Stensrud J, Petersen FC, Benneche T, Scheie AA. Synthetic bromated furanone inhibits autoinducer-2-mediated communication and biofilm formation in oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22(5):340-6.
- Lönn-Stensrud J, Landin MA, Benneche T, Petersen FC, Scheie AA. Furanones, potential agents for preventing *Staphylococcus epidermidis* biofilm infections? *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(2):309-16.
- Lönn-Stensrud J, Benneche T, Scheie AA. Furanones and thio-phenones in control of *Staphylococcus epidermidis* biofilm infections? I: Mendez-Vilas A, editor. Science and technology against microbial pathogens. Research, development, and evaluation. Proceedings of the International Conference on Antimicrobial Research (ICAR 2010). World Scientific Books; 2010. p.155-9.