

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
Studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike

Valentina Živković

**ISPITIVANJE SPOSOBNOSTI
STVARANJA BIOFILMA KOD
KLINIČKIH IZOLATA
PSEUDOMONAS AERUGINOSA I
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
Studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike

Valentina Živković

**ISPITIVANJE SPOSOBNOSTI
STVARANJA BIOFILMA KOD
KLINIČKIH IZOLATA
PSEUDOMONAS AERUGINOSA I
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Završni rad

Osijek, 2017.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Katedra za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju

Mentor rada: doc.dr.sc. Domagoj Drenjančević

Rad ima 31 radna lista, 17 tablica i 5 slika.

Zahvala

Zahvaljujem se svom mentoru doc. dr. sc. Domagoju Drenjančeviću na nesebičnoj pomoći i ustupljenom vremenu tijekom izrade završnog rada.

Zahvaljujem se Jasminki Talapko, dipl. ing. MLD i tehničarki Dajani Gutler na stručnoj pomoći, korisnim savjetima, razumijevanju, trudu te strpljenju tijekom istraživanja i izrade rada.

Posebno hvala mojim roditeljima, dečku i prijateljima jer su uvijek bili uz mene, vjerovali u mene i pružali mi podršku, razumijevanje i ljubav.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Definicija biofilma	1
1.2. Nastanak biofilma	2
1.3. Utjecaj biofilma na cijeljenje kroničnih infekcija	4
1.4. Identifikacija biofilma	5
1.5. Karakteristike <i>Staphylococcus aureus</i> i stvaranje biofilma	5
1.6. Karakteristike <i>Pseudomonas aeruginosa</i> i stvaranje biofilma.....	6
2. CILJ RADA	8
3. MATERIJALI I METODE RADA	9
3.1. Ustroj studije	9
3.2. Kulture mikroorganizama	9
3.3. Priprema uzoraka	9
3.4. Kvantifikacija biofilma	10
3.5. Statističke metode	11
4. REZULTATI	12
4.1. Testiranje preduvjeta za korištenje parametrijskih postupaka	12
4.2. Deskriptivna obrada podataka	12
4.3. Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma kliničkih izolata <i>S. aureus</i> i <i>P. aeruginosa</i> korištenjem dvaju različita medija za uzgoj	15
4.4. Ispitivanje sposobnosti stvaranja biofilma s obzirom na različit bakterijski soj	17
4.5. Ispitivanje sposobnosti detekcije biofilma u ovisnosti o <i>in vitro</i> uvjetima	20
5. RASPRAVA	23
6. ZAKLJUČAK	25
7. SAŽETAK	26
8. SUMMARY	27
9. LITERATURA	28
10. ŽIVOTOPIS	31

1. UVOD

1.1. Definicija biofilma

Kroz povijest mikroorganizmi su opisani kao planktoni i slobodne jedinke čije su se karakteristike s vremenom definirale uz pomoć hranjivih podloga u laboratorijskim uvjetima. Izolacija bakterija iz njihova habitata i kultivacija na obogaćenim hranjivim podlogama omogućili su identifikaciju mnogih bakterijskih vrsta te ispitivanje njihovih svojstava koja se koriste u svrhu dijagnostike raznih oblika bolesti zbog njihove sposobnosti kolonizacije ljudskog organizma (1). Napretkom znanosti i brojnim istraživanjima dolazi se do spoznaje da veliki broj mikroorganizama može tvoriti zajednice štetne za ljudski organizam zbog rezistencije na antibiotsku terapiju, što otežava uspješno liječenje, a riječ je o biofilmu.

Stvaranje biofilma pripada dodatnim čimbenicima virulencije koji su još uvijek predmet brojnih istraživanja jer stvaraju velik zdravstveni problem pri kroničnim infekcijama i implantatima. Za razliku od planktonskih organizama koji se slobodno kreću u tekućoj sredini, biofilm je sesilna zajednica mikroorganizama adheriranih na površinu supstrata okružena ekstracelularnom polimernom matricom koja čini više od 90% suhe mase biofilma. To je višestanična struktura koja štiti bakterije od nepovoljnih čimbenika okoline, čineći ih izrazito otpornima na razne antibiotike te na taj način omogućava veće preživljavanje bakterija, skladišti hranu koja služi za opstanak biofilma i štiti ih od fagocitoze, čime im je osiguran opstanak u organizmu domaćina.

Vrlo je bitna karakteristika biofilma i otpornost na dezinficijense jer je pritom onemogućeno uklanjanje s površina i potencijalan je problem za domaćina zbog toga što su takvi mikroorganizmi sposobni trajno kolonizirati organizam s patološkim posljedicama. Biofilm je potrebno promatrati kao pokretnu funkcionalnu zajednicu obilježjima kompletnog mikroorganizma jer, između ostaloga, imaju homeostazu, cirkulacijski sustav, izmjenu genetičkog materijala poput ostalih bakterija i metaboličku aktivnost, čime si osiguravaju daljnji razvitak (2). Osim toga, bakterije zaštićene biofilmom sposobne su raspršiti pojedinačne bakterijske stanice i odumrle dijelove biofilma u okolna tkiva i cirkulacijski sustav. Takve diseminirane stanice mogle bi biti odgovorne za nastanak akutnih bolesti.

Dok su u prošlosti akutne infekcije najčešće završavale smrtnim ishodom, razvojem antimikrobioloških tehnika one su svedene na minimalnu razinu, a danas problem stvaraju kronične infekcije. Upravo je nastanak biofilma u tijeku kroničnih infekcija jedan od

čimbenika njihova razvoja i progresije zbog otežanog liječenja jer je glavna karakteristika biofilma rezistencija na široki spektar antimikrobnih lijekova (3). Kronične infekcije kod kojih je dokazano stvaranje biofilma jesu primjerice periodontitis, kronični prostatitis, bakterijska vaginoza, kronična upala srednjeg uha, osteomijelitis, kronična infekcija pluća u oboljelih od cistične fibroze i infekcije kroničnih rana (4).

Biofilm ima definiranu arhitekturu koja je podložna povremenim izmjenama zbog vanjskih i unutarnjih čimbenika. Između ostaloga, omogućuje idealno okruženje za međusobnu izmjenu genetskog materijala. Komunikacija stanica u biofilmu događa se posredovanjem produkata koje stvaraju, a zatim prelaze iz jedne stanice u drugu i na taj način održavaju svoju zajednicu. Tvari poput mineralnih kristala, čestica korozije ili krvne komponente, ovisno o mjestu gdje nastaje biofilm, također se mogu naći u njegovoj strukturi. No, najznačajnije, u medicinskim uređajima ili pak ljudskom organizmu biofilm čini jedna vrsta mikroorganizama s pridruženom ekstracelularnom polimernom supstancom. Ekstracelularna polimerna matrica vrlo je hidrirana jer ima sposobnost u svojoj strukturi ugraditi veliku količinu vode u vodikove veze (5). Kruto tekuća barijera između površine i vodene sredine omogućava zajednici biofilma optimalne uvjete za rast i opstanak mikroorganizama u njoj.

Ovakva fizikalno-kemijska obilježja površine na kojoj nastaje sesilna zajednica utječu na brzinu i količinu vezanja bakterije za površinu. Količina kolonizacije proporcionalno se povećava povećanjem neravnosti površine jer su takve površine veće i mikroorganizmi se brže vežu za hidrofobne površine poput plastike nego na hidrofilne, a važan su problem u liječenju bolesnika i infekcije povezane s biomaterijalima. Hidrofilna svojstva gram negativnim bakterijama, između ostalog, daje i prisutnost antigena O lipopolisaharida (5). Osim hidrofobnosti, jačinu vezanja posjeduju i već spomenute flagele i fimbrije (5,6). Uz sve veću prisutnost mikroorganizama nedjelotvornih na antibiotsku terapiju, strategije za kontrolu bakterijskih infekcija postale su prioritet znanstvenih istraživanja. Jedna takva strategija uključuje korištenje virusa koji inficiraju i ubijaju bakterije (7).

1.2. Nastanak biofilma

Tolker-Nielsen i Molin zaključili su kako je svaka zajednica biofilma drugačija, iako su pojedini strukturni dijelovi jednaki u svakoj zajednici (8). U biofilmu nalazimo ekstracelularne polimerne tvari poput proteina, polisaharida, nukleinskih kiselina i lipida.

Takav raspored tvari u biofilmu utječe na njegova funkcionalna svojstva koja su potencijalan problem pri nastanku kroničnih infekcija (4,9).

Prvi i najvažniji korak u nastanku biofilma vezanje je za biotičke i abiotičke površine. Nakon uspješnog vezanja bakterija se nakuplja u gomilu i dobiva mnogostruke signale za formiranje biofilma, a pripijene, nepokretne stanice pak luče egzopolisaharidni matriks. Ako su prisutni svi uvjeti potrebni biofilmu, on se razvija i proces se naziva sazrijevanje biofilma (2). Ekstracelularni polisaharidi spojevu su koje luče mikroorganizmi u svojoj okolini, a važni su za vezanje na određene površine i održavanje strukture biofilma koji formiraju, a istovremeno kompetitivno djeluju u organizmu s fiziološkim tvarima. Polisaharidi koji se luče pri formiranju biofilma omogućuju stanici rezistenciju na antibiotike i bolji rast i razvitak. Za razliku od stanica koje luče polisaharide, stanice koje ih ne proizvode ne iskorištavaju polisaharide stanica koje ga luče. Biofilm stvaraju isključivo stanice koje polisaharide produciraju u dovoljnoj količini (10). Biofilm se može stvarati na raznim mjestima; slatkim i slanim vodama, stijenama, medicinskim implantatima, a okom gledano izgleda poput guste, neprozirne mase. Može se vezati na dva načina: aktivno, pomoću flagela, pila, i pasivno, djelovanjem gravitacijske sile. Sljedeća faza koju Dunne naziva „fazom zaključavanja“ nastaje djelovanjem ekstracelularne polimerne tvari, u kojoj dolazi do jačanja veze između bakterije i tvari na koju se određena bakterija veže (2).

Nekoliko ekoloških i genetskih signala kontrolira svaki korak razvoja i raspršivanja biofilma. Nakupljanje signalnih molekula u okolišu omogućuje svakoj pojedinoj bakterijskoj stanici procjenu stanične gustoće, odnosno ukupnog broja bakterija u tom trenutku, a ta se pojava naziva detekcija kvoruma (QS od eng. quorum sensing). Signalne su molekule u gram-negativnih bakterija N-acil-homoserinski laktoni (AHL), a u gram-pozitivnih bakterija to su mali ili modificirani peptidi (11). Koncentracija signalnih molekula postignuta pri točno određenoj kritičnoj gustoći stanica postaje dovoljna za aktivaciju gena uključenih u sintezu faktora virulencije ili sekundarnih metabolita (11). Tvorba i raspršivanje biofilma visoko su kontrolirani procesi regulirani na genetskoj razini i signali okoliša. Između ostaloga, QS, ciklički diguanozin-5'-monofosfat (c-di-GMP) i male RNA (sRNA) smatraju se glavnim regulatorima pri stvaranju biofilma.

Detekcija kvoruma smatra se posebnim načinom komunikacije, koji se koristi za intercelularnu komunikaciju, koja se temelji na malim, samogeneriranim signalnim molekulama pod nazivom autoinduceri. Kada su prisutne dovoljne količine bakterija kao i koncentracija autoinduktora zadovoljavajuću graničnu razinu, bakterije počinju osjećati njihovu kritičnu masu i odgovor potiskivanjem ili aktiviranjem ciljnih gena (12).

QS sustavi igraju vrlo važnu ulogu tijekom razvoja i raspršivanja bakterijskih biofilmova. Iako ovi sustavi nisu uključeni u vezivanje i početne faze rasta biofilmova, oni su potrebni za njihov daljnji razvoj biofilmova i također su glavni regulatori raspršivanja biofilma (13).

Drugi glavni regulator biofilma, c-di-GMP signalna mreža, smatra se najslženijim sekundarnim signalnim sustavom otkrivenim u bakterijama. Međutim, njegova složenost značajno varira i ova vrsta signalizacije odsutna je kod nekih bakterija (14). Nakon vezanja na različite stanične receptore, c-di-GMP kontrolira bakterijsku transkripciju, aktivnost enzima, pa čak i funkcioniranje većih staničnih struktura (15). Bakterije iz biofilma pri vezanju za površinu mijenjaju ekspresiju gena u odnosu na stanje kada čine planktonsku populaciju, što dodatno doprinosi formiranju biofilma i njegovim funkcionalnim karakteristikama. *Pseudomonas aeruginosa* aktivira gen *algC* koji aktivira enzim phosphomannomutase, koji je ključan za sintezu egzopolisaharida alginata te je aktivnost povećana četverostruko. Kod *Staphylococcus aureus* aktivirana su četiri gena koji reguliraju sintezu enzima uključenih u proces glikolize koji je glavni metabolički put razgradnje glukoze u citoplazmi stanica, a drugi je proces fermentacija koja se odvija zbog nedostatka kisika u biofilmu (2,5).

1.3. Utjecaj biofilma na cijeljenje kroničnih infekcija

Pojava biofilma u implantantima (centralni venski kateter, srčane valvule, medicinski proizvodi za fiksacije fraktura) i raznim kirurški ugrađenim uređajima stvara kronične infekcije, uzrokuje odbacivanje implantata, nefunkcionalnost ugrađenog uređaja, oštećenje organa, a ponekad i smrtan ishod pacijenta. Takve infekcije vrlo je teško izliječiti i spriječiti njihovo patološko djelovanje zbog rezistencije biofilma na antibiotsku terapiju koju mu daje matrica biofilma. Biofilm ima izazito visoku patogenost i virulentnost te oslabljeni imunološki sustav domaćina dovodi do nastanka mnogih infekcija. Takve bakterijske zajednice stvaraju se na dnu rana, u anaerobnim uvjetima. Bakterije uzrokuju sporo i teško zacjeljivanje rana, posljedično tome, ponekad i sepsu, kroničnu bol i amputaciju. Pojava biofilma u ranama uzrokuje perzistentnu upalu i potreban je dulji period za zacjeljivanje u odnosu na zacjeljivanje bez prisutnosti biofilma u organizmu.

Uzrok je tomu sposobnost inhibicije stanične proliferacije i nemogućnost migracije odgovarajućih stanica na mjesto oštećenja. Takva sposobnost bakterijskog biofilma dobro je opisana kod vrsta *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Detaljnim istraživanjima utvrđeno je da se radi o aktivaciji alfa hemolizina, alkohol dehidrogenazi, laktat dehidrogenazi i epidermalnim staničnim razlikovnim inhibitorima. Sprječavanje adhezije

biofilma daje bolji ishod za pacijenta nego liječenje kronične infekcije uzrokovane biofilmom jer se time izbjegava dugotrajno i neučinkovito antibakterijsko liječenje (9). Problem koji se povezuje s primjenom nedjelotvornih antibiotika je i uništavanje normalne bakterijske flore u organizmu. Primjerice, tetraciklini mijenjaju normalnu crijevnu floru tako što suprimiraju osjetljive koliformne mikroorganizme s posljedičnim prekomjernim rastom pseudomonasa, proteusa, stafilokoka, otpornih koliformnih bakterija, klostridija i kandida. To može rezultirati probavnim smetnjama analnim svrbežom: vaginalnom ili oralnom kandidijazom ili teškim enterokolitisom s posljedičnim šokom ili smrću (16).

1.4. Identifikacija biofilma

Otkrivanje biofilma i njegova identifikacija od velikog je značaja za sam ishod i učinkovitost liječenja jer što se prije počne djelovati na biofilm, veća je vjerojatnost izliječenja takve infekcije. No, ipak, jedna je od karakteristika biofilma fiziološka heterogenost, što otežava otkrivanje biofilma. Metode otkrivanja biofilma temelje se na kultivaciji na laboratorijskim hranjivim podlogama, ali je nedostatak ovakve metode dug proces do dobivanja rezultata. Pouzdanije je rješenje primjena molekularnih metoda poput lančane reakcije polimeraze (PCR) i fluorescentne in situ hibridizacije (FISH). Nova metoda izravne vizualizacije trodimenzionalne strukture biofilma, konfokalna laserska skener mikroskopija, temelji se na vizualizaciji 16S ribosomne RNA uz FISH metodu (9).

1.5. Karakteristike *S. aureus* i stvaranje biofilma

Staphylococcus aureus fakultativni je anaerob, gram pozitivni kok koji se u mikroskopskim preparatima vidi u grozdastim nakupinama. Stanična stijenka građena je od peptidoglikana i teikoične kiseline, a na njezinoj površini nalazi se polisaharidna kapsula koja štiti bakteriju. Na površini stijenke nalazi se površinski protein A, čija je karakteristika vezanje za Fc fragment IgG-a. Početni stupanj kolonizacije *S. aureus* posredovan je brojnim površinskim proteinima, od kojih se svaki veže za elemente domaćina u i na tkivima, tjelesnim tekućinama ili stranim tijelima, no *S. aureus* nije jako infektivan, osim ako je riječ o ozljedi, stranom tijelu, padu imunološkog sustava domaćina. Tada je sposoban ugroziti život domaćina smrtnim ishodom (4). Oportunistički je patogen i glavni je uzrok bakterijemije, a čak i uz odgovarajuće antimikrobno liječenje uzrokuje visoku smrtnost. Ulaskom u kardiovaskularni sustav može dovesti do ozbiljnih komplikacija poput infektivnog

endokarditisa ili tromboflebitisa, što dovodi do zatajenja organa. Ključni događaj kojim *S. aureus* uzrokuje infektivni proces njegovo je vezanje za endotelne stanice, gdje se zadrži intracelularno, skriven od djelovanja imunološkog sustava i izvanstaničnog antimikrobnog liječenja (17). Tijekom formiranja biofilma stanice oslobađaju citoplazmatske proteine i DNA, koji se ponovno stvaraju i formiraju izvanstanični matriks koji veže preostale stanice zajedno u velikim skupinama (18).

Središnji regulator kontrole produkcije biofilma peptidni je QS sustav, također poznat kao pomoćni gen regulator (*eng. accessory gene regulator*) ili *agr* sustav. Kod oportunističkog patogena *S. aureus*, *agr* sustav kontrolira produkciju egzotoksina i egzoenzima nužnih za stvaranje infekcija te istovremeno modulira njegovu sposobnost za prihvaćanje za površine i razvoj biofilma (19).

1.6. Karakteristike *P. aeruginosa* i stvaranje biofilma

Pseudomonas aeruginosa aerobni je, gram-negativni štapić koji u mikroskopskom preparatu bojanom po Gramu izgleda kao kratki, ravni štapić, pojedinačno, u parovima, lancima ili složeni jedan pored drugoga, a pojedini sojevi posjeduju i polisaharidnu kapsulu. Posjeduje brojne čimbenike virulencije i toksičnosti te je jedan od značajnijih uzročnika bolničkih infekcija. *P. aeruginosa* oportunistički je ljudski patogen. Često kolonizira imunokompromitirane pacijente, poput onih s cističnom fibrozom, malignom bolešću ili AIDS-om (20). *P. aeruginosa* uzrokuje infekciju u tri koraka. Prvi je korak bakterijska kolonizacija na koži ili sluznicama organizma procesom adherencije pomoću flagela, nakon čega slijedi daljnja invazija tkiva i organskih sustava, te nastanak diseminirane bolesti, sepse, pri čemu lipopolisaharid ima glavnu ulogu u njezinu nastanku (4). *P. aeruginosa* najčešći je patogen izoliran od pacijenata koji su hospitalizirani duže od tjedan dana, infekcije koje uzrokuje komplicirane su i mogu završiti smrtnim ishodom (21).

Produkcija biofilma kod bakterija posebno je istraživana upravo kod *P. aeruginosa*. Istraživanja su se uglavnom usmjeravala na faktore uključene u produkciju biofilma poput prianjanja za površine, pokretljivosti, produkcije matriksa itd. S obzirom na prianjanje za površine, za subpopulacije *P. aeruginosa* utvrđene su tri podskupine; s difuznim, konvektivnim i aktivnim, flagelama posredovanim transportom. Što se pak tiče pokretljivosti, definirane su nepokretne (formiraju mikrokolonije poput „stabljike gljive“) i pokretne (formiraju mikrokolonije poput „kape gljive“) subpopulacije. Uloga izvanstaničnog matriksa, odnosno izvanstanične polimerne tvari (EPS od *eng. extracellular polymeric substance*), u

stvaranju i održavanju biofilma kod ovog patogena vrlo je slična ulozi koju ima i kod drugih vrsta. EPS pruža zaštitu stanicama biofilma, pomaže u prianjaju za površine te interakcijai među stanicama i subpopulacijama. Drugi glasnik, c-di-GMP, važan je regulator u sintezi polisaharida i proteina koji predstavljaju osnovnu komponentu EPS (22).

2. CILJ RADA

Cilj je ovog istraživanja je ispitati sposobnost formiranja biofilma kliničkih izolata *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* korištenjem dvaju različitih medija za uzgoj – Mueller-Hinton i Luria Bertani, što osigurava različite laboratorijske uvjete za uzgoj, usporediti sposobnost stvaranja biofilma među bakterijskim vrstama i usporediti sposobnost detekcije biofilma u ovisnosti o *in vitro* uvjetima.

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1. Ustroj studije

Ova je studija eksperimentalno *in vitro* istraživanje.

3.2. Kulture mikroorganizama

U istraživanju je korišteno 30 sojeva *Pseudomonas aeruginosa* i 30 sojeva *Staphylococcus aureus* dobivenih iz kliničkih uzoraka. Korištene su bakterije iz zbirke bakterijskih sojeva Katedre za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

3.3. Priprema uzoraka

Nakon što su bakterije uzgajane na krvnom agaru tijekom 24 sata inkubacije, s ezom je uzeto dvije do tri pojedinačne kolonije kulture bakterija koje su potom inokulirane u 3 ml Mueller Hinton (Becton Dickinson and Co., Cockeysville MD, USA) i Luria Bertani (Difco R Luria Bertani broth, Becton Dickinson, USA) bujona. Suspenzije su zatim bile inkubirane u termostatu na 37°C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije, epruvete su dobro promiješane na mješalici (Vortexu) i presađeno je 20 μ l soja iz prijašnje suspenzije u nove epruvete s 2 ml Mueller Hinton i Luria Bertani bujonom. Ovim postupkom pripremljene su suspenzije gustoće (5×10^5 CFU/mL) koje su korištene za ispitivanje sposobnosti stvaranja biofilma. Nakon pripreme suspenzije su nasadene na poliesterske mikrotitarske pločice s ravnim dnom (Copan, Brescia, Italia), u koje je za kontrolu ispipetirano 100 μ l čistog MH i LB bujona, a u preostala tri mjesta (triplikat plus kontrola) po 50 μ l čistog MH i LB bujona i 50 μ l pripravljene suspenzije. Potom je nasadena mikrotitarska pločica inkubirana u termostatu tijekom 24 sata pri temperaturi 37°C. Nakon inkubacije, na staničevini je dobro istresen bujon i ispran destiliranom vodom triput. Zatim je slijedilo bojanje 0,1% – *tnim* kristal violetom te solubilizacija sa 95% – *tnim* etanolom, što je prikazano na slici 1 (1).

3.4. Kvantifikacija biofilma

Završni je korak mjerenje produkcije biofilma spektrofotometrijskim očitavanjem na čitaču mikrotitarskih pločica za enzimske imunoeseje (BioRad 93200 PR3100 TSC Microplate Reader) na 550 nm. Očitavanjem su dobivene vrijednosti optičke gustoće u pojedinoj jažici, što predstavlja produkciju biofilma u toj jažici. Te su vrijednosti dalje izražene kao njihova srednja vrijednost, odnosno OD (od eng. *optical density*). Potom se pomoću formule izračunala granična vrijednost produkcije biofilma (pri kojoj se proizvodi bar malo biofilma), OD_c (od eng. *optical density cut-off value*), na način da su se srednjoj vrijednosti OD-a negativnih kontrola dodale tri standardne devijacije negativnih kontrola. Dobiveni rezultati klasificirani su na sljedeće kategorije: neproduktori, slabi, umjereni i jaki produktori biofilma (1,23). Način interpretacije dobivenih rezultata prikazan je u tablici 1.

Mjerenja su rađena u triplikatu.

Tablica 1. Prikaz kriterija za ocjenjivanje produkcije biofilma

$OD < OD_c$	Neproduktori
$OD_c < OD < 2 \times OD_c$	Slabi produktori
$2 \times OD_c < OD < 4 \times OD_c$	Umjereni produktori
$4 \times OD_c < OD$	Jaki produktori

Legenda: OD = srednja vrijednost produkcije biofilma u pojedinoj jažici; OD_c = granična vrijednost produkcije biofilma (pri kojoj se proizvodi bar malo biofilma)



Slika 1. Mikrotitarske pločice (Copan, Brescia, Italia), s pripremljenim sojevima za sprektofotometrijsko očitavanje (fotografirala Dajana Gutler, Medicinski fakultet Osijek)

3.5. Statističke metode

Dobiveni rezultati obrađeni su pomoću programskog paketa za statističku obradu – SPSS 19.0., a u samoj obradi podataka provedena je provjera normaliteta distribucija i izračun deskriptivnih podataka, podrazumijevajući frekvencije, postotke, medijan i interkvartilni raspon te Wilcoxonov test ekvivalentnih parova, χ^2 test uz Fisherov egzaktni test i Cramerov $V(\phi)$ koeficijent za testiranje značajnosti razlika između dviju ili više nezavisnih skupina.

4. REZULTATI

4.1. Testiranje preuvjeta za korištenje parametrijskih postupaka

Kako bi se pravilno odabrale statističke mjere za prikaz prikupljenih rezultata, testirani su normaliteti distribucija korištenih varijabli. Prema vrijednostima Kolmogorov-Smirnovljevog testa, većina distribucija pokazuje normalnu raspodjelu ($P > 0,05$), dok ostale pokazuju odstupanje od normaliteta distribucije ($p < 0,05$). Ipak, zbog vrlo malog uzorka, Kolmogorov-Smirnovljev test nije opravdano uzimati u obzir kao jedinu mjeru normaliteta distribucije jer je vrlo osjetljiv na broj sudionika (24). Dodatnim pregledom histograma utvrđeno je kako distribucije vidljivo odstupaju od normalne te su stoga u daljnjoj analizi korištene neparametrijske mjere prikaza rezultata.

4.2. Deskriptivna obrada podataka

Daljnja obrada podataka uključivala je analizu deskriptivne statistike koja omogućuje pregled pojavnosti te osnovne podatke varijabli za koje je deskriptivnu analizu bilo moguće provesti. Dobiveni podatci vidljivi su u Tablici 2, Tablici 3, Tablici 4 i Tablici 5.

Tablica 2. Incidencija i deskriptivni podatci za *S. aureus* korištenjem Luria-Bertani bujon medija za uzgoj

<i>Staphylococcus aureus</i>	frekvencija ukupno	% ukupno	C	Q
LB_1	30	100	0.081	0.030
LB_2	30	100	0.086	0.029
LB_3	30	100	0.088	0.037
Kontrola	30	100	0.059	0.014
OD(AR)	30	100	0.085	0.031

Legenda: C=medijan; Q=interkvartilni raspon; LB=Luria-Bertani bujon; OD(AR)=prosječna optička gustoća

Tablica 3. Incidencija i deskriptivni podatci za gram *S. aureus* korištenjem Mueller-Hinton bujon medija za uzgoj

<i>Staphylococcus aureus</i>	frekvencija ukupno	% ukupno	C	Q
MH_1	30	100	0.091	0.036
MH_2	30	100	0.098	0.039
MH_3	30	100	0.102	0.052
Kontrola	30	100	0.076	0.011
OD(AR)	30	100	0.097	0.043

Legenda: C=medijan; Q=interkvartilni raspon; MH=Mueller-Hinton bujon; OD(AR)= prosječna optička gustoća

U Tablici 2 i Tablici 3 prikazani su deskriptivni podatci za vrstu *S. aureus* korištenjem dvaju različitih medija za uzgoj, Mueller-Hinton bujon i Luria-Bertani bujon. Podatci podrazumijevaju frekvencije i njima pripadajuće postotke pojavnosti kroz oba medija za uzgoj te medijane i interkvartilne raspone za svaku korištenu varijablu. Iz prikazanih rezultata moguće je vidjeti raspršenje rezultata (Q) oko središnje vrijednosti, odnosno, medijana (C).

Tablica 4. Incidencija i deskriptivni podatci za *P. aeruginosa* korištenjem Luria-Bertani bujon medija za uzgoj

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	frekvencija ukupno	% ukupno	C	Q
LB_1	30	100	0.244	0.577
LB_2	30	100	0.308	0.459
LB_3	30	100	0.294	0.455
Kontrola	30	100	0.032	0.017
OD(AR)	30	100	0.318	0.481

Legenda: C=medijan; Q=interkvartilni raspon; LB=Luria-Bertani bujon; OD(AR)= prosječna optička gustoća

Tablica 5. Incidencija i deskriptivni podatci za *P. aeruginosa* korištenjem Mueller-Hinton bujon medija za uzgoj

<i>Pseudomonas</i>	frekvencija	%	C	Q
<i>aeruginosa</i>	ukupno	ukupno		
MH_1	30	100	0.354	0.647
MH_2	30	100	0.285	0.668
MH_3	30	100	0.298	0.670
Kontrola	30	100	0.070	0.007
OD(AR)	30	100	0.330	0.602

Legenda: C=medijan; Q=interkvartilni raspon; MH=Mueller-Hinton bujon; OD(AR)= prosječna optička gustoća

Iz priloženih tablica mogu se vidjeti deskriptivni podatci za gram negativne sojeve *P. aeruginosa* korištenjem dvaju različitih medija za uzgoj, Mueller-Hinton bujon i Luria-Bertani bujon. Uspoređujući dobivene podatke za oba korištena soja kroz oba medija za uzgoj (Tablice 2-5), može se uočiti kako je interkvartilno raspršenje veće kod sojeva *P. aeruginosa* u odnosu na *S. aureus*. Dobiveni deskriptivni podatci također su klasificirani u ranije opisane kategorije prema klasifikaciji Stepanovića i suradnika (25), a one podrazumijevaju slabe, umjerene i jake produktore biofilma te sojeve koji ne produciraju biofilm. Podatci prema navedenim kategorijama i korištenim sojevima opisani su u Tablici 6 i Tablici 7.

Tablica 6. Kategorijalni prikaz razine produkcije biofilma za *S. aureus* korištenjem Luria-Bertani i Mueller-Hinton bujon medije za uzgoj

<i>Staphylococcus aureus</i>	nema produkcije f (%)	slabi produktor f (%)	umjereni Produktor f (%)	jaki produktor f (%)
LB	17 (56.7)	13 (43.3)	0 (0)	0 (0)
MH	19 (63.4)	9 (30)	1 (3.3)	1 (3.3)

Legenda: LB=Luria-Bertani bujon; MH=Mueller-Hinton bujon; f=frekvencija

Tablica 7. Kategorijalni prikaz razine produkcije biofilma za *P. aeruginosa* korištenjem Luria-Bertani i Mueller-Hinton bujon medije za uzgoj

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	nema produkcije	slabi produktor	umjereni produktor	jaki produktor
	f (%)	f (%)	f (%)	f (%)
LB	0 (0)	8 (26.7)	4 (13.3)	18 (60)
MH	4 (13.3)	6 (20)	5 (16.7)	15 (50)

Legenda: LB=Luria-Bertani bujon; MH=Mueller-Hinton bujon; f=frekvencija

Pregledom Tablice 6 može se uočiti kako se za *S. aureus*, za Luria- Bertani bujon, u 43,3 % slučajeva javlja slaba, a u 56,7 % slučajeva nikakva produkcija biofilma u svim mjerenjima, kao i za Mueller-Hinton bujon, gdje se u 30 % slučajeva javila slaba produkcija biofilma, a u 63,4 % slučajeva nikakva produkcija, s tim da se kod Mueller-Hinton bujona pojavila u jednom mjerenju i umjereni i jaka produkcija te svaka čini 3,3 % ukupne produkcije.

U Tablici 7 prikazana je pojavnost biofilma za *P. aeruginosa* za dva različita uzgoja. Kod Luria-Bertani bujona u svim mjerenjima postojala je razina produkcije biofilma. Tako je slabe produkcije bilo 26,7 %, umjerene produkcije 13,3 % te jake produkcije u 60,0 % slučajeva. Po pitanju Mueller-Hinton bujona, u 13,3 % slučajeva nije bilo produkcije biofilma, u 20, 0 % slučajeva javila se slaba produkcija, umjereni produkcija javila se u 16.7 % slučajeva, a jaka produkcija u 50, 0 % slučajeva. Za gram negativni soj *P. aeruginosa* može se uočiti kako je u oba uzgoja najveći postotak pojavnosti imala jaka produkcija biofilma, što nije slučaj kod gram pozitivnog soja *S. aureu*, gdje se jaka produkcija pojavila samo u jednom mjerenju u Mueller-Hinton bujonu.

4.3. Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma kliničkih izolata *S. aureus* i *P. aeruginosa* korištenjem dvaju različitih medija za uzgoj

Korištenjem Wilcoxonovog testa ekvivalentnih parova ispitivalo se postojanje statistički značajnih promjena u stvaranju biofilma kliničkih izolata *S. aureusa* i *P. aeruginosa* korištenjem različitih medija za uzgoj, Luria-Bertani bujon i Mueller-Hinton bujon. Posebno je rađena statistička obrada za svaki soj, u svakom mediju za uzgoj. Podatci su prikazani u niže navedenim tablicama.

Tablica 8. Prikaz rezultata Wilcoxonovog testa ekvivalentnih parova za zavisne uzorke pri testiranju statističke značajnosti nastajanja biofilma gram pozitivnog soja *S. aureus* u Luria-Bertani bujonu i Mueller-Hinton bujonu.

<i>Staphylococcus aureus</i>			
Wilcoxonov test	Z vrijednost	razina značajnosti	N
Luria-Bertani bujon	-4,464	p < .01	30
Mueller-Hinton bujon	-4,752	p < .01	30

Legenda: N=broj sudionika

Tablica 9. Prikaz rezultata Wilcoxonovog testa ekvivalentnih parova za zavisne uzorke pri testiranju statističke značajnosti nastajanja biofilma gram negativnog soja *P. aeruginosa* u Luria-Bertani bujonu i Mueller-Hinton bujonu.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Wilcoxonov test	Z vrijednost	razina značajnosti	N
Luria-Bertani bujon	-4,782	p < .01	30
Mueller-Hinton bujon	-4,617	p < .01	30

Legenda: N=broj sudionika

Pregledom Tablica 8 i 9 može se uočiti kako su dobivene statistički značajne razlike, odnosno, promjene u nastanku biofilma za sve sojeve, kod obiju bakterija (*S. aureus* i *P. aeruginosa*) te kod oba medija za uzgoj (Luria-Bertani i Mueller-Hinton bujon). Pokazalo se da su sojevi gram pozitivne bakterije *S. aureus* uspješno, statistički značajno, stvarali biofilm u oba medija za uzgoj. Isto se pokazalo i za sojeve gram negativne bakterije *P. aeruginosa*. Dodatnim testiranjem veličine efekta ovih statistički značajnih razlika dobiven je visoki efekt (Cramerov V (ϕ) koeficijent, $r = -0.815$) za *S. aureus* u Luria-Bertani bujonu te visoki efekt ($r = -0.867$) za *S. aureus* u Mueller-Hinton bujonu. Nadalje, dobiven je visoki efekt ($r = -0.873$) za *P. aeruginosa* u Luria-Bertani bujonu te visoki efekt ($r = -0.843$) za *P. aeruginosa* u Mueller-Hinton bujonu.

4.4. Ispitivanje sposobnosti stvaranja biofilma s obzirom na različit bakterijski soj

Korištenjem χ^2 testova provjeravalo se postojanje statistički značajnih razlika između varijabli *S. aureus* i *P. aeruginosa* u svakom mediju za uzgoj, odnosno, u Luria-Bertani bujonu i Mueller-Hinton bujonu. Za svaki χ^2 test prikazana je kontingencijska tablica te Fisherov egzaktni test i Cramerovog V koeficijent s obzirom na to da se radi o kategorijalnim varijablama s niskim vrijednostima u pojedinim ćelijama.

Tablica 10. Prikaz kontingencijske tablice za *P. aeruginosa*S. aureus* u Luria-Bertani mediju za uzgoj**

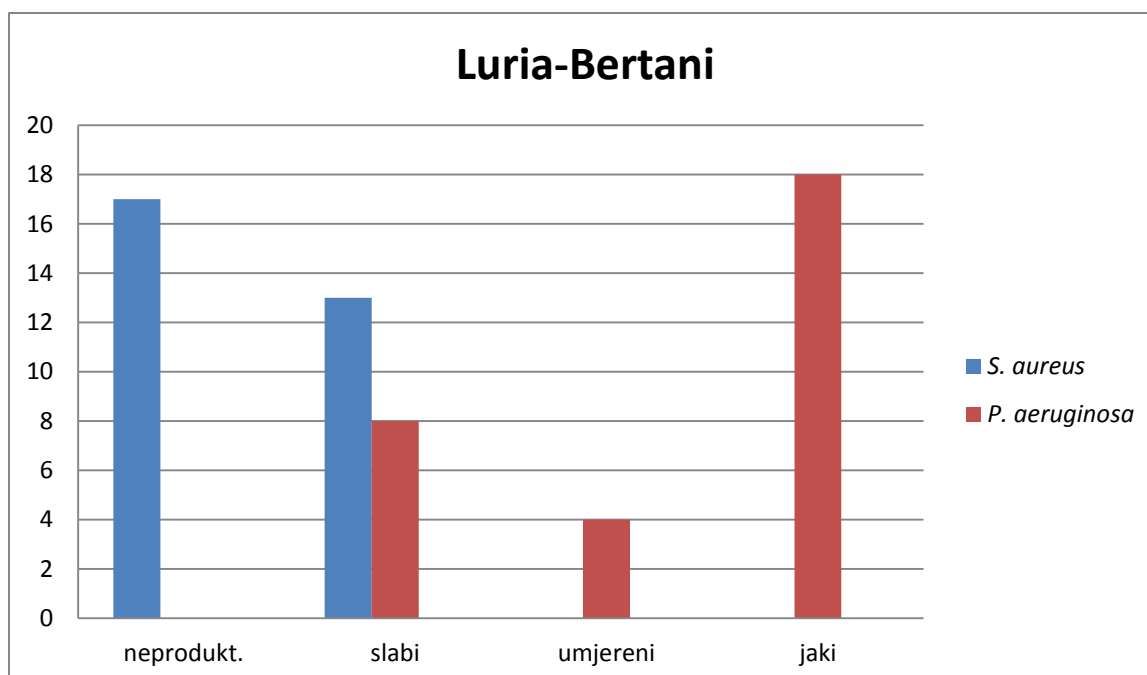
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			ukupno
		slabi produktori	umjereni produktori	jaki produktori	
<i>Staphylococcus aureus</i>	neproductori	2 6.7%	2 6.7%	13 43.3%	17 56.7%
	slabi produktori	6 20.0%	2 6.7%	5 16.7%	13 43.3%
	ukupno	8 26.7%	4 13.3%	18 60.0%	30 100.0%

Tablica 11. Prikaz Fisherovog egzaktnog testa i Cramerovog V koeficijenta za nezavisne uzorke pri testiranju značajnosti razlika između varijabli *S. aureus* i *P. aeruginosa* u Luria-Bertani mediju za uzgoj

	vrijednost	df	P
Fisherov egzaktni test	5.020	2	.075
Cramerov V	.413	2	.078
N	30		

Legenda: df=stupnjevi slobode; p=razina statističke značajnosti; N=ukupni broj mjerenja

Pregledom Tablica 10 i 11 može se uočiti kako nije dobivena statistički značajna razlika u stvaranju biofilma između sojeva *S. aureus* i *P. aeruginosa* u Luria-Bertani mediju za uzgoj.



Slika 2. Prikaz produkcije biofilma između sojeva *S. aureus* i *P. aeruginosa* u Luria-Bertani mediju za uzgoj.

Na slici 2 vidljiv je grafički prikaz produkcije biofilma između vrsta *S. aureus* i *P. aeruginosa* na Luria-Bertani bujonu. Uočavamo da su se sojevi *P. aeruginosa* pokazali kao jači produktori nego sojevi *S. aureus* u istom hranilištu.

Tablica 12. Prikaz kontingencijske tablice *P. aeruginosa*S. aureus* u Mueller-Hinton mediju za uzgoj**

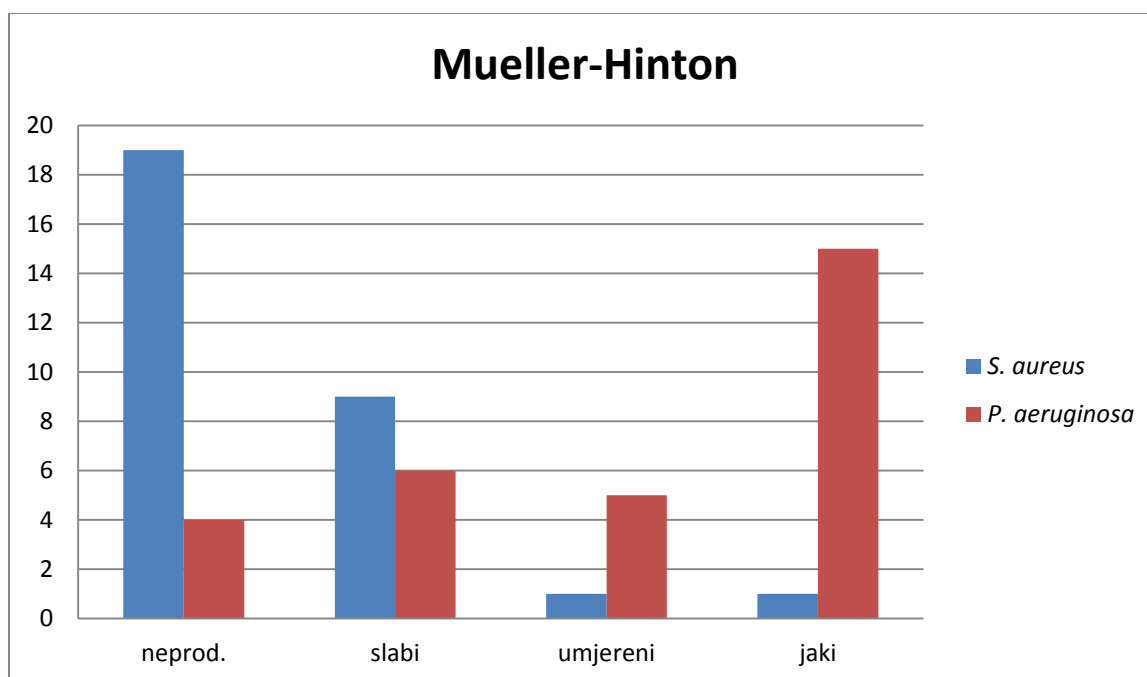
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				ukupno
		neproductori	slabi produktori	umjereni produktori	jaki produktori	
<i>Staphylococcus aureus</i>	neproductori	3 10%	3 10.0%	3 10.0%	10 33.3%	19 63.3%
	slabi produktori	0 0%	2 6.7%	2 6.7%	5 16.7%	9 30.0%
	umjereni produktori	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%
	jaki produktori	0 0%	1 3.3%	0 0%	0 0%	1 3.3%
	ukupno	4 13.3%	6 20.0%	5 16.7%	15 50.0%	30 100.0%
	ukupno					

Tablica 13. Prikaz Fisherovog egzaktnog testa i Cramerovog V koeficijenta pri testiranju značajnosti razlika između varijabli *S. aureus* i *P. aeruginosa* u Mueller-Hinton mediju za uzgoj

	vrijednost	Df	P
Fisherov egzaktni test	10.017	9	.359
Cramerov V	.369	9	.200
N	30		

Legenda: df=stupnjevi slobode; p=razina statističke značajnosti; N=ukupni broj mjerenja

Pregledom Tablica 12 i 13 može se uočiti kako nije dobivena statistički značajna razlika u stvaranju biofilma između sojeva *S. aureus* i *P. aeruginosa* u Mueller-Hinton mediju za uzgoj.



Slika 3. Prikaz produkcije biofilma između sojeva *S. aureus* i *P. aeruginosa* u Mueller-Hinton mediju za uzgoj.

Na slici 3 grafički je prikazana produkcija biofilma između sojeva *S. aureus* i *P. aeruginosa* na Mueller-Hinton bujonu. Dok se najviše sojeva *P. aeruginosa* pokazalo kao jaki produktor, najviše se sojeva *S. aureus*, suprotno tomu, pokazalo kao neproduktor.

4.5. Ispitivanje sposobnosti detekcije biofilma u ovisnosti o *in vitro* uvjetima

Nadalje su u statističkoj obradi izračunati χ^2 testovi kako bi se provjerilo postojanje statistički značajnih razlika između varijabli Luria-Bertani bujon i Mueller-Hinton bujon za sojeve *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Za svaki χ^2 test prikazana je kontingencijska tablica te Fisherov egzaktni test i Cramerovog V koeficijent s obzirom na to da se radi o kategorijalnim varijablama s niskim vrijednostima u pojedinim ćelijama.

Tablica 14. Prikaz kontingencijske tablice za Luria-Bertani*Mueller-Hinton medije za uzgoj kod bakterijskog soja *S. aureus*

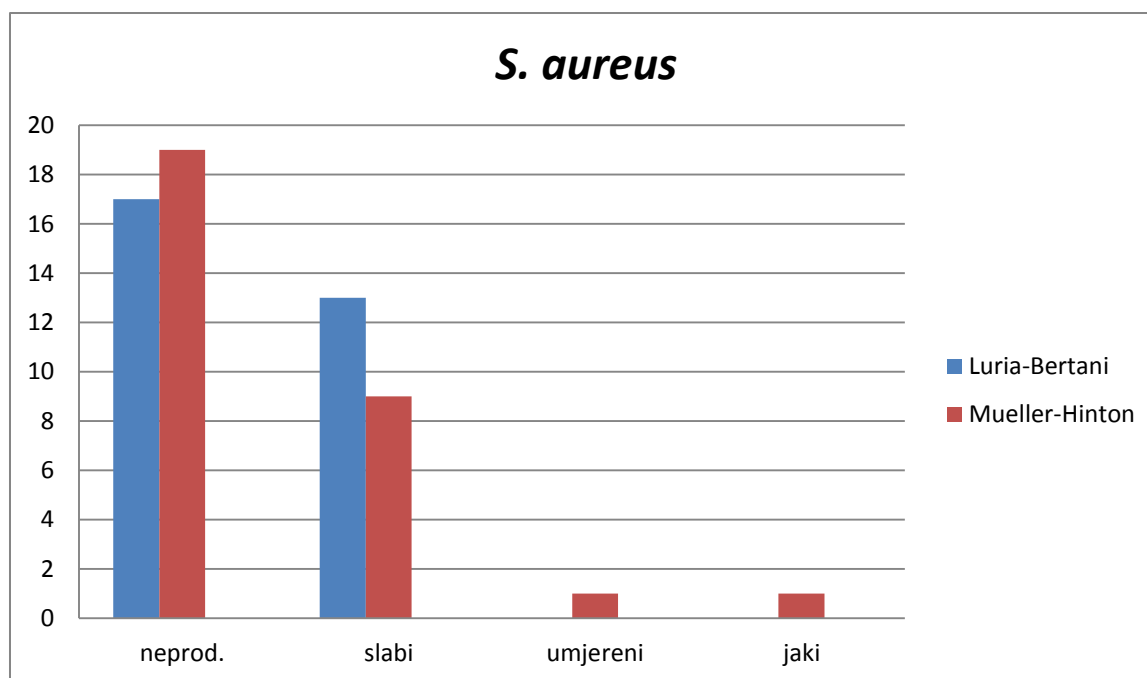
		Mueller-Hinton				ukupno
		neproductori	slabi productori	umjereni productori	jaki productori	
Luria - Bertani	neproductori	10	6	1	0	17
	slabi	9	3	0	1	13
	productori					

Tablica 15. Prikaz Fisherovog egzaktnog testa i Cramerovog V koeficijenta pri testiranju značajnosti razlika između varijabli Luria-Bertani i Mueller-Hinton medija za uzgoj kod bakterijskog soja *S. aureus*

	vrijednost	df	P
Fisherov egzaktni test	2.432	3	.664
Cramerov V	.292	3	.464
N	30		

Legenda: df=stupnjevi slobode; p=razina statističke značajnosti; N=ukupni broj mjerenja

Iz prikazanih Tablica 14 i 15 može se vidjeti kako nije dobivena statistički značajna razlika u stvaranju biofilma između Luria-Bertani i Mueller-Hinton medija za uzgoj kod bakterijske vrste *S. aureus*.



Slika 4. Prikaz produkcije biofilma sojeva *S. aureus* na Luria-Bertani i Mueller-Hinton medijima za uzgoj.

Slika 4 grafički prikazuje produkciju biofilma sojeva *S. aureus* na Luria-Bertani i Mueller-Hinton bujonu. Dok se na oba bujona bilježi podjednaka pojavnost neproduktora i slabih produktora, na Mueller-Hinton bujonu našao se i po jedan umjereni i jedan jaki produktor.

Tablica 16. Prikaz kontingencijske tablice za Luria-Bertani*Mueller-Hinton medije za uzgoj kod bakterijske vrste *P. aeruginosa*

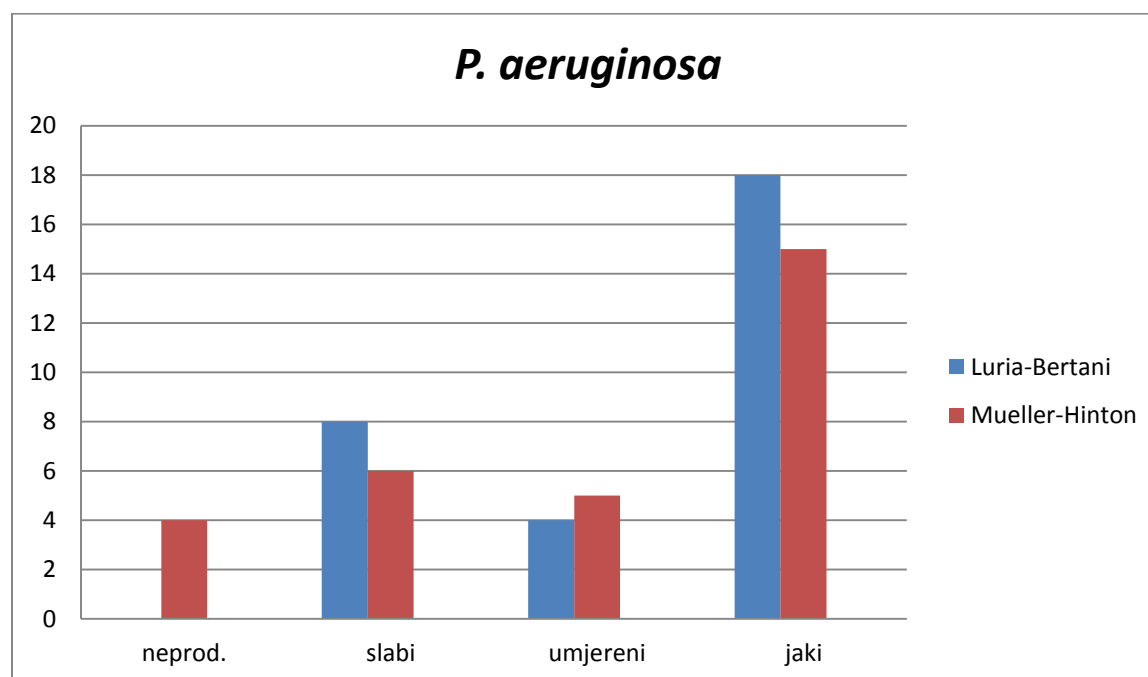
		Mueller-Hinton				ukupno
		neproduktori	slabi produktori	umjereni produktori	jaki produktori	
Luria-Bertani	slabi produktori	3	1	1	3	8
	umjereni produktori	0	1	0	3	4
	jaki produktori	1	4	4	9	18
	ukupno	4	6	5	15	30

Tablica 17. Prikaz Fisherovog egzaktnog testa i Cramerovog V koeficijenta pri testiranju značajnosti razlika između varijabli Luria-Bertani i Mueller-Hinton medija za uzgoj kod bakterijskog soja *P. aeruginosa*

	vrijednost	df	P
Fisherov egzaktni test	5.465	2	.476
Cramerov V	.342	2	.320
N	30		

Legenda: df=stupnjevi slobode; p=razina statističke značajnosti; N=ukupni broj mjerenja

Tablice 16 i 17 prikazuju da nije dobivena statistički značajna razlika u stvaranju biofilma između varijabli Luria-Bertani i Mueller-Hinton medija za uzgoj kod bakterijskog soja *P. aeruginosa*



Slika 5. Prikaz produkcije biofilma sojeva *P. aeruginosa* na Luria-Bertani i Mueller-Hinton medijima za uzgoj.

Na slici 5 vidimo grafički prikaz produkcije biofilma sojeva *P. aeruginosa* na bujonima Luria-Bertani i Mueller-Hinton. Na Muller-Hinton bujonu najveća je pojavnost jakih produkatora, upola je manje slabih i umjerenih produkatora te tek nekoliko neproduktora. Na Luria-Bertani bujonu zabilježena je daleko najveća pojavnost jakih produkatora u cijelom istraživanju, nešto manje od pola od jakih iznosi pojavnost slabih produkatora, a pola od slabih čini pojavnost umjerenih produkatora. Neproduktora pak na ovom hranilištu nije bilo.

5. RASPRAVA

Glavna spoznaja do koje dolazimo interpretirajući dobivene rezultate jest da obje bakterijske vrste, gram pozitivni *S. aureus* i gram negativni *P. aeruginosa*, uspješno i statistički značajno stvaraju biofilm u oba hranilišta; Luria-Bertani i Mueller-Hinton (tablice 8 i 9). Ova je činjenica ishodišna točka gledišta, odnosno analiziranja svih ostalih rezultata dobivenih u istraživanju. Naime, temeljni cilj istraživanja bio je utvrditi proizvode li klinički izolati *S. aureus* i *P. aeruginosa* u navedenim hranilištima biofilm u statistički značajnim količinama. Kako se pokazalo da su oba soja statistički značajni produktori biofilma, nameću se pitanja usporedbe produkcije među sojevima te sposobnost produkcije biofilma u ovisnosti o *in vitro* uvjetima.

Gledajući podatke o incidencijama i deskriptivne podatke o sojevima u obama bujona, (tablice 2-5), koji su izraženi medijanom (rezultat oko kojeg se podatci najviše okupljaju) i raspršenjem (interval u kojem se nalazi 50 % centralnih podataka), kao najznačajniji podatak primjećujemo da je interkvartilno raspršenje veće kod soja *P. aeruginosa* u odnosu na *S. aureus*. Iz toga iščitavamo da je kod soja *P. aeruginosa* veća pojavnost ekstremnih vrijednosti te samim time i veći raspon rezultata. Ovaj je podatak u skladu s činjenicom da su kod *P. aeruginosa* najveću pojavnost imali jaki produktori, a manju umjereni i slabi produktori, za razliku od *S. aureus*, gdje su većinom izmjereni slabi i umjereni produktori, što je doprinijelo ovakvom rasponu i načinu raspršenja rezultata.

Daljnjom analizom rezultata nailazimo na konkretne podatke o kvaliteti i kvantiteti detektiranih produkatora, odnosno frekvencijama njihove pojavnosti (tablice 6,7). Kod sojeva *S. aureus* tako primjećujemo vrlo skromnu proizvodnju biofilma na obama bujona. Dok se u Luria-Bertani bujonu u 43,3 % slučajeva javlja slaba, a u preostalim nikakva produkcija, na Mueller-Hinton bujonu nalazimo još manji broj slabih produkatora (30 %), a skoro sve ostalo su neproduktori, s izuzetkom pojavnosti jednog umjerenog (3,3 %) te jednog jakog (3,3 %) produkatora. Kao što je već navedeno kod analize interkvartilnog raspršenja, kod rezultata sojeva *P. aeruginosa* uočavamo izrazitu pojavu jakih produkatora u obama hranilištima. U Luria-Bertani bujonu, gdje je ujedno i najznačajnija produkcija biofilma u cijelom istraživanju, svi su se mjereni sojevi pokazali kao produktori biofilma. Slabih je produkatora bilo 26,7 %, umjerenih 13,3 %, a jakih čak 60,0 %. U odnosu na Luria-Bertani, u Mueller-Hinton bujonu, uz smanjenje broja slabih (20,0 %) i jakih (50,0 %) produkatora, neznatno se povećao broj

umjerenih (16,7 %), a pojavio se i određeni, u odnosu na *S. aureus* i dalje manji, broj neproduktora (13,3 %) biofilma.

Svakako se treba osvrnuti i na usporedbu produkcije biofilma s obzirom na bakterijske sojeve i s obzirom na hranilišta. Iako, kako je već spomenuto, postoje razlike u proizvodnji biofilma između sojeva *S. aureus* i *P. aeruginosa* te između bujona Luria-Bertani i Mueller-Hinton, čini se kako te razlike ipak nisu statistički značajne. Statističkom obradom rezultata Fischerovim egzaktnim testom ni u jednom testiranju (niti kod bujona niti kod sojeva), nismo dobili vrijednost P (razina statističke značajnosti) manju od 0,05. To nas vodi do zaključka da nema statistički značajne razlike u stvaranju biofilma niti između sojeva *S. aureus* i *P. aeruginosa* u Mueller-Hinton ni u Luria-Bertani bujonu. Također ni između bujona Mueller-Hinton i Luria-Bertani kod sojeva *S. aureus* ni kod sojeva *P. aeruginosa* (tablice 10-17, slike 2-5).

Rezultati koje smo dobili slažu se i s prijašnjim medicinskim i mikrobiološkim saznanjima o stvaranju biofilma kod brojnih kroničnih infekcija, među kojima su periodontitis, kronični prostatitis, bakterijska vaginoza, kronična upala srednjeg uha, osteomijelitis, kronična infekcija pluća u oboljelih od cistične fibroze i infekcije kroničnih rana (4), s obzirom na to da su upravo ispitivane bakterije, *S. aureus* i *P. aeruginosa*, česti uzročnici mnogih od navedenih infekcija.

Sukladno tome, i druga istraživanja su pokazala kako su obje navedene bakterijske vrste produktori biofilma, neovisno iz kojih su kliničkih uzoraka izolirani (sputum, urin, urinski kateter i sl.), iako najznačajniji problem predstavljaju urinski kateteri (26). Osim ove podudarnosti, proučavanjem drugih srodnih istraživanja te usporedbom dobivenih rezultata razliku možemo naći u intenzitetu produkcije biofilma. U navedenom članku (26) korišteni su bujoni *Congo red agar* i *Tube method* te su se na oba obje bakterijske vrste pokazale kao iznimno jaki produktori biofilma (više od 80 % jakih produktora). U ovom su se pak istraživanju na korištenim bujonima Luria-Bertani i Mueller-Hinton sojevi *P. aeruginosa* pokazali kao jaki produktori u 55 % slučajeva, podjednako na oba bujona, a među sojevima *S. aureus* pronašao se tek jedan jaki produktor (26).

I ovo istraživanje, kao i niz srodnih istraživanja, pruža niz mogućnosti za analizu i usporedbe dobivenih rezultata, od usporedbe produkcije među bakterijskim populacijama, vrstama i ispitivanim sojevima, do onih među korištenim hranilištima. Osim toga, u istraživanju možemo napraviti i neke dodatne testove poput, kao u navedenom članku, testa za osjetljivost na antibiotike kojim možemo utvrditi dodatna svojstva kvalitete produkcije biofilma među bakterijama, kao i dodatne raznolikosti (26).

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata, zaključci su sljedeći:

- Za obje bakterijske vrste, gram pozitivni *S. aureus* i gram negativni *P. aeruginosa*, pokazalo se da uspješno, statistički značajno, stvaraju biofilm u oba medija za uzgoj (Luria-Bertani i Mueller-Hinton).
- Sojevi *S. aureus* na Luria-Bertani bujonu u 43,3 % slabi su produktori, a u 56,7 % neproduktori biofilma u svim mjerenjima, dok su na Mueller-Hinton bujonu u 30 % slabi produktori, u 64,3 % neproduktori, a u jednom mjerenju pojavljuje se i po jedan umjereni i jaki produktor, od kojih svaki čini 3,3 %.
- Sojevi *P. aeruginosa* na Luria-Bertani bujonu u svim su se mjerenjima pokazali kao produktori biofilma; slabih je produkatora bilo 26,7 %, umjerenih 13,3 % te jakih 60,0 %. Na Mueller-Hinton bujonu pak u 13,3 % slučajeva bili su neproduktori, u 20,0 % slabi produktori, u 16,7 % umjereni, a u 50,0 % slučajeva jaki produktori.
- Iz navedenih rezultata može se iščitati da je za gram negativni soj *P. aeruginosa* na oba bujona najveći postotak pojavnosti imala jaka produkcija, za razliku od *S. aureus*, gdje se jaka produkcija pojavila u samo jednom mjerenju.
- Nadalje, nema statistički značajne razlike u stvaranju biofilma između sojeva *S. aureus* i *P. aeruginosa* ni na Luria-Bertani bujonu ni na Mueller-Hinton bujonu.
- Također, u usporedbi između bujona Luria-Bertani i Mueller-Hinton niti kod gram pozitivne bakterije *S. aureus* ni kod gram negativne *P. aeruginosa* nije bilo statistički značajne razlike u proizvodnji biofilma.
- U istraživanju je vidljivo da i u različitim *in vitro* uvjetima ispitivane bakterijske vrste uspješno stvaraju biofilm, što neizravno upućuje na poznate spoznaje o patogenosti i virulenciji ovih uzročnika i može doprinijeti boljem razumijevanju njihovih *in vivo* osobina u izazivanju infekcija povezanih s biofilmom.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Svrha ovog istraživanja bila je ispitati sposobnost formiranja biofilma kliničkih izolata *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* na dvama različitim bujonima, Mueller-Hunton i Luria-Bertani, usporediti sposobnost stvaranja biofilma između dviju navedenih bakterijskih vrsta te usporediti sposobnost detekcije biofilma s obzirom na *in vitro* uvjete, odnosno bujone.

Materijali i metode: U istraživanju je korišteno 30 sojeva *Pseudomonas aeruginosa* i 30 sojeva *Staphylococcus aureus* dobivenih iz kliničkih uzoraka. Nakon pripreme, suspenzije bakterija inokuliranih na bujone nasadene su na mikrotitarske pločice, izmjerena je produkcija biofilma na spektrofotometrijskom čitaču na 550 nm te su rezultati dobiveni pomoću formula klasificirani u četiri kategorije.

Rezultati: Rezultati su pokazali da oba ispitivana soja, uspješno i statistički značajno, stvaraju biofilm u oba navedena medija za uzgoj. Iz navedenih rezultata može se iščitati da je za gram negativni soj *P. aeruginosa* na oba bujona najveći postotak pojavnosti imala jaka produkcija, dok se kod *S. aureus* jaka produkcija pojavila u samo jednom mjerenju. Nadalje, nema statistički značajne razlike u stvaranju biofilma između sojeva ni na jednom ni na drugom korištenom bujonu, a isto se pokazalo i pri usporedbi stvaranja između bujona i kod jedne i kod druge bakterije.

Zaključak: Rezultati ovog istraživanja neizravno upućuju na poznate spoznaje o patogenosti i virulenciji ovih uzročnika i mogu doprinijeti boljem razumijevanju njihovih *in vivo* osobina u izazivanju infekcija povezanih s biofilmom.

Ključne riječi: biofilm, *P. aeruginosa*, *S. aureus*

8. SUMMARY

INVESTIGATION OF BIOFILM FORMATION OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA AND STAPHYLOCOCCUS AUREUS CLINICAL ISOLATES

Objectives: The goal of this investigation is to examine the ability of forming biofilm in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on two different broths - Mueller-Hinton and Luria-Bertani, as well as to compare the ability to form biofilm among the two mentioned types of bacteria and the ability of detecting the biofilm considering in vitro conditions, that is broths.

Material and methods: 30 strains of *Pseudomonas aeruginosa* and 30 strains of *Staphylococcus aureus* obtained from clinical specimens were used for this investigation. After preparing the suspensions of bacteria inoculated on broths, they were set on microtiter plates and the biofilm production was measured using the spectrophotometric reader on 550 nm. The final results based on the formulas were classified into four categories.

Results: The results showed that both of the tested strains, successfully and statistically significant, form a biofilm in both of the above mentioned broths. The results clearly indicate that for the gram negative *P.aeruginosa* strain in both broths the highest percentage of occurrence had a strong production, whereas in *S.aureus* a strong production appeared only in one measurement. Furthermore, there is no statistically significant difference in the biofilm formation between the strains on neither of the used strain and the same results occurred after comparing the formation between the broths in both of the bacteria.

Conclusion: The results of this investigation indirectly point to known cognitions of pathogenicity and virulence of these agents and can contribute to the better understanding of their *in vivo* characteristics in causing of infections related to biofilm.

Key words: biofilm, *P. aeruginosa*, *S. aureus*

9. LITERATURA

1. Milanov D, Bugarski D, Petrović J, Rackov O. Primena testa na mikrotitracionim pločama i mikroskopskih tehnika u ispitivanju sposobnosti nekih bakterijskih vrsta izolovanih od životinja da formiraju biofilm. *Arhiv veterinarske medicine*. 2010; 3:23-37.
2. Milanov D, Ašanin R, Vidić B, Krnjajić D, Petrović J. Biofilm – organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. *Arhiv veterinarske medicine*. 2008; 1(2)
3. Vraneš J, Leskovar V. Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija. *Med glas*. 2009; 6(2):147-164.
4. Kalenić S i sur. *Medicinska mikrobiologija*. 14. izd. Zagreb. Medicinska naklada. 2013.
5. Rodney MD. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Journal list*. 2002;8(9): 881–890.
6. Characklis WG, McFeters GA, Marshall KC. *Physiological ecology in biofilm systems*. New York: John Wiley & Sons; 1990. p. 341–94.
7. Secor PR, Sass G, Nazik H, Stevens DA. Effect of acute predation with bacteriophage on intermicrobial aggression by *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS One*. 2017;12(6):e0179659
8. Tolker-Nielsen T, Molin S. Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb Ecol*. 2000;40:75–84
9. Škrilin J. Utjecaj biofilma na cijeljenje rane i postupak za identifikaciju biofilma u rani. *Acta Med Croatica*. 2016;70(1):29-32.
10. Irie Y, Roberts AEL, Kragh KN, Gordon VD, Hutchison J, Allen RJ, i sur. The *Pseudomonas aeruginosa* PSL Polysaccharide Is a Social but Noncheatable Trait in Biofilms. *MBio*. 2017;8(3):00374-17.
11. Hentzer M, Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*. 2003;112:1300-7.
12. de Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun*. 2000;68:4839–4849.
13. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998;280:295–298.

14. Römling U. Cyclic di-GMP, an established secondary messenger still speeding up. *Environ Microbiol.* 2012;14:1817–1829.
15. Goodman AL, Merighi M, Hyodo M, Ventre I, Filloux A, Lory S. Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev.* 2009;23(2):249-59.
16. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Temeljna i klinička farmakologija*. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
17. Perez-Montarelo D, Viedma E, Murcia M, Munoz-Gallego I, Larossa N, Branäs P, i sur. Pathogenic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Endovascular Infection Isolates from Different Clonal Complexes. *Front Mikrobiol.* 2017;19;8:917.
18. DeFrancesco AS, Masloboeva N, Syed AK, DeLoughery A, Bradshaw N, Li GW i sur. Genome-wide screen for genes involved in eDNA release during biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114(29):E5969-E5978.
19. Kavanaugh JS, Horswill AR. Impact of Environmental Cues on Staphylococcal Quorum Sensing and Biofilm Development. *JBC Papers in Press.* 2016;291(24): 12556–12564.
20. Botzenhardt K, Döring G. Ecology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa as an Opportunistic Pathogen.* 1993; p. 1-7.
21. Medscape. *Pseudomonas aeruginosa Infections*. Dostupno na adresi: <http://emedicine.medscape.com/article/226748-overview>
Datum pristupa:15.4.2017.
22. Harmsen M, Yang L, Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010;59(3):253-68.
23. Ghellai L, Hassaine H, Klouche N, Khadir A, Aissaoui N, Nas F. i sur. Detection of biofilm formation of a collection of fifty strains of *Staphylococcus aureus* isolated in Algeria at the University Hospital of Tlemcen. *Academic Journals.* 2014;6(1):1-6.
24. Petz, B., Kolesarić, V. i Ivanec, D. *Petzova statistika. Osnovne statističke metode za nematematičare.* Jastrebarsko. Naklada Slap.
25. Stepanović S, Vuković D, Hla V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I i sur. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and

practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci.
APMIS. 2007. 115(8):891-9.

26. Rewatkar AR, Wadher BJ. Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa-
Biofilm formation methods. IOSR-JPBS. 2013;8(5):36-40

10. ŽIVOTOPIS

VALENTINA ŽIVKOVIĆ

Datum i mjesto rođenja:

- 23.10.1995., Osijek

Obrazovanje:

- 2002. – 2010. Osnovna škola „Ivan Filipović“, Osijek
- 2010. – 2014. Medicinska škola Osijek, zdravstveno laboratorijska tehničarka
- 2014. do danas. Medicinski fakultet Osijek, Studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike

POTVRDA O LEKTURI

Završni rad Valentine Živković, studentice preddiplomskog studija medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku, „Ispitivanje sposobnosti stvaranja biofilma kod *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*“, lektorirala je i prilagodila gramatičko-pravopisnoj normi hrvatskoga jezika Ivana Stipić, profesorica hrvatskoga jezika i književnosti. Rad je lektoriran prema gramatičkim pravilima hrvatskoga jezika te prema pravilima koja propisuje Hrvatski pravopis Instituta za hrvatski jezik i jezikoslovlje.

Ivana Stipić, prof.

POTVRDA O LEKTURI

Završni rad Valentine Živković, studentice preddiplomskog studija medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku, „Ispitivanje sposobnosti stvaranja biofilma kod *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*“, lektorirala je i prilagodila gramatičko-pravopisnoj normi engleskoga jezika Danijela Štefanić, profesorica engleskog i njemačkog jezika.

Danijela Štefanić, prof.