

Rola biofilmu bakteryjnego w patogenezie wysiękowego zapalenia ucha środkowego

The role of bacterial biofilms in the pathogenesis of otitis media with effusion

ARTUR NIEDZIELSKI ^{1/}, MARIA KOZIOL-MONTEWKA ^{2/}, GRAŻYNA NIEDZIELSKA ^{1/}, AGNIESZKA BOGUT ^{2/}, JOLANTA PALUCH-OLEŚ ^{2/},
MICHAŁ KOTOWSKI ^{1/}, MACIEJ MONTEWKA ^{2/}, BEATA KASZTELEWICZ ^{2/}

^{1/} Katedra i Klinika Otolaryngologii Dziecięcej, Foniatrii i Audiologii AM w Lublinie

^{2/} Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej AM w Lublinie

Ostre wysiękowe zapalenie ucha środkowego (OME) jest najczęściej skutkiem przemijającej dysfunkcji trąbki słuchowej wskutek obrzęku błony śluzowej i nadmiaru wydzieliny.

Wysiękowe zapalenie ucha środkowego często rozwija się w następstwie ostrego zapalenia ucha środkowego wywołanego przez Gram-ujemne i Gram-dodatnie bakterie, głównie *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* i *Moraxella catarrhalis*. Powyższe obserwacje sugerują, że OME ma etiologię zakaźną, jednakże hodowle aspiratów ucha środkowego są pozytywne tylko w 20-40% przypadków tej choroby. Większość wysięków w OME pozostaje bakteryjnie negatywna, oporna na leczenie antybiotykami, lecz podatna na wiele zapalnych czynników pośredniczących. Przewlekłe zapalenie ucha środkowego z wysiękiem przez długi czas było uważane za sterylny proces zapalny. Zastosowanie technologii diagnostyki molekularnej sugeruje obecność żywych bakterii tworzących kompleksowe zbiorowości znane jako biofilmy śluzówkowe.

Gromadzenie się bakterii w biofilmie jest interesującą hipotezą społeczności bakterii, w której organizmy te przywierają do powierzchni lub do siebie nawzajem, co w następstwie prowadzi do ich zredukowanej aktywności metabolicznej oraz wyższej odporności na antybiotyki. Badania eksperymentalne dostarczają dowodów sugerujących, że formacja biofilmu może być ważnym czynnikiem w patogenezie OME.

Słowa kluczowe: *biofilm, wysiękowe zapalenie ucha środkowego, hodowla bakteryjna, PCR*

Acute otitis media with effusion (OME) most often results from temporal disfunction of the Eustachian tube due to oedema of mucous membrane and excess of secretion.

OME is often a consequence of acute otitis media caused by Gram-negative and Gram-positive bacteria, mainly *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* i *Moraxella catarrhalis*. This suggests that the etiology of OME is infectious, however bacterial cultures from a middle ear effusion are positive only in 20-40% of cases. The majority of middle ear effusions in cases of OME remain culture-negative, resistant to antibiotics, but susceptible to many inflammatory mediators.

Chronic otitis media with effusion has been considered for a long time as a sterile inflammatory process. However, the use of molecular diagnostic techniques suggests the presence of live bacteria forming communities known as mucosal biofilms.

A biofilm is a community in which bacteria adhere to a surface or to each other, resulting in reduced metabolism and higher resistance to antibiotics. Some experimental results prove that biofilm formation may be a crucial factor in the pathogenesis of OME.

Key words: *biofilm, otitis media with effusion, bacterial culture, PCR*

Nadesłano: 10.03.2006

Oddano do druku: 19.07.2006

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Artur Niedzielski

Katedra i Klinika Otolaryngologii Dziecięcej, Foniatrii i Audiologii AM, 20-093 Lublin, ul. Witolda Chodźki 2

tel/fax: +48 81 7416173; e-mail: ped-ork@poczta.onet.pl

Przewlekłe wysiękowe zapalenie ucha środkowego (*otitis media with effusion* – OME) jest definiowane jako obecność płynu w uchu środkowym bez objawów ostrej infekcji ucha. Głównym objawem chorobowym jest niedosłuch przewodzeniowy, który może być przyczyną opóźnionego rozwoju mowy w populacji dziecięcej. W złożonej patogenezie tego schorzenia uwzględnia się wiele czynników, często wzajemnie nakładających się.

Ostre wysiękowe zapalenie ucha środkowego najczęściej towarzyszy przemijającej dysfunkcji trąbki

śluchowej będącej skutkiem obrzęku błony śluzowej i nadmiaru wydzieliny. Nieodwracalne zmiany, np. zwężenie trąbki słuchowej powodują przewlekłe lub nawracające zapalenia ucha środkowego. Oprócz dysfunkcji trąbki słuchowej istotną rolę w patogenezie OME odgrywa również dyfuzja gazów w obrębie wyścielających ucho środkowe tkanek, unaczynienie i pneumatyzacja wyrostka sutkowatego.

Rola bakterii w patogenezie OME

Analizując problem udziału drobnoustrojów w powstaniu OME, które jest często następstwem ostrego zapalenia ucha środkowego, brane są pod uwagę wyniki hodowli i ocen z zastosowaniem technik PCR oraz możliwości infekcji wywołanej przez specyficzne formy-L bakterii lub wzrost bakterii w postaci biofilmu. Najczęściej izolowanymi drobnoustrojami z ucha środkowego metodą hodowli są *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* i *Moraxella catarrhalis*, rzadziej izolowane są *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* lub stwierdzane są zakażenia mieszane. Wyniki, podobnie jak w zakażeniach nosogardła, są zbliżone zarówno w badaniach populacji dzieci z Polski jak i innych krajów [1-4]. Powyższe obserwacje sugerują, że OME ma etiologię zakaźną, jednakże hodowle aspiratów ucha środkowego są pozytywne tylko w 20-40% przypadków OME [4]. Większość wysięków w OME pozostaje bakteryjnie negatywna, oporna na leczenie antybiotykami, aczkolwiek równocześnie stwierdza się podwyższone stężenia cytokin prozapalnych IL-1, TNF- α , IL-8, IFN- γ i innych wskaźników aktywacji miejscowego odczynu zapalnego [5, 6, 7]. Biorąc pod uwagę, że przyczyną negatywnych wyników w hodowli może być zbyt mała liczba bakterii w płynie wysiękowym lub obecność form L, które nie wzrastają na podłożach hodowlanych, czy też obecność bakterii wolno namnażających się lub o wyjątkowych wymaganiach wzrostowych, przeprowadzono liczne badania z zastosowaniem metod molekularnych [8].

Przeprowadzone badania przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) wykazały obecność bakteryjnego DNA w wysięku w ponad 80%, co zaprzecza hipotezie, że wysięk w OME to wysięk sterylny [9, 10]. Jednoznaczność wyników PCR poddawano jednak pod wątpliwość, jako że wykrycie pojedynczych genów może być wynikiem obecności jedynie przetrwałych fragmentów DNA lub „skamieniałymi pozostałościami bakterii”, jak stwierdził *Cantekin* [11].

Złożone relacje zachodzące w uchu środkowym pomiędzy patogenem a gospodarzem mogą być również przyczyną ujemnych wyników uzyskanych w tradycyjnej metodzie hodowlanej. Jedną z nich dotyczy możliwości powstania szczególnych form bakterii L. Te warianty bakteryjne tracą zdolność do syntetyzowania warstwy peptydoglikanowej nowej ściany komórkowej, przez

co zmieniają nie tylko swój oryginalny kształt, ale stają się odporne na antybiotyki beta-laktamowe oraz wymagają szczególnych warunków do hodowli [12].

Wzrost bakterii w postaci biofilmu

Rozwijana w ciągu ostatnich lat hipoteza, która mogłaby wyjaśnić nietypowe zachowanie się wskaźników infekcji podczas wysiękowego zapalenia ucha środkowego, wskazuje na wzrost drobnoustrojów w specyficznych wielowarstwowych zespołach zwanych biofilmem. Bakterie wykazują wówczas inne właściwości niż drobnoustroje wzrastające planktonicznie. Tworzą one bakteryjne społeczności, w których drobnoustroje przywierają do powierzchni za pomocą fimbrii lub nawzajem do siebie. Otoczone są wydzielaną substancją polisacharydową typu matriks, wykazują zredukowaną aktywność metaboliczną, co między innymi skutkuje wyższą opornością na czynniki antibakteryjne i ujemnymi wynikami posiewów płynu wysiękowego. Wzrost bakterii w postaci biofilmu, lub pozbawionych ściany komórkowej form L bakterii może być spowodowany terapią antybiotykową lub immunologiczną reakcją gospodarza. Dodatkowo, formy L bakterii lub mikroorganizmy w biofilmie charakteryzują się mniejszą aktywnością metaboliczną i reprodukcyjną w porównaniu z bakteriami planktonowymi. Uważane są za częściowo odpowiedzialne za przewlekłe zapalenie i przedłużające się wysięki w uchu środkowym u dzieci. Bakterie rozwijające się jako biofilm reprezentują odmienny fenotyp niż wolno żyjące bakterie, posiadają one nie tylko znacznie zredukowaną aktywność metaboliczną, co czyni je niemal całkowicie niepodatnymi na leczenie przeciwbakteryjne, ale również wytwarzana na zewnątrz biofilmu egzopolisacharydowa matriks chroni je przed fagocytozą oraz innymi mechanizmami obronnymi gospodarza. Obniżona aktywność metaboliczna oraz częstotliwość podziału bakterii w biofilmie w dużym stopniu wyjaśniają nieskuteczność antybiotyków podczas leczenia infekcji u pacjentów. Leczenie za pomocą antybiotyków niszczy bakterie na peryferiach, natomiast głęboko położone organizmy pozostają i działają na zasadzie gniazda warunkującego ponowny rozwój oraz wzrost, a także periodyczny rozsiew planktoniczny, który może być przyczyną przewlekłego stanu zapalnego i infekcji układowych. Powyższy charakter biofilmu mógłby wyjaśniać dlaczego antybiotyki nie są skuteczne w leczeniu OME.

Hipoteza biofilmu jest także spójna z obserwacją, że najefektywniejszym leczeniem wysiękowego zapalenia ucha jest umieszczanie tubek wentylacyjnych przez błonę bębenkową. Procedura ta pozwala na „by-pass” przepływu powietrza przez dysfunkcyjną trąbkę Eustachiusza, pozwalając na wentylację przestrzeni ucha środkowego. Niskowentylowane ucho środkowe jest idealnym środowiskiem dla formowania się biofilmu, jako że wcześniejsza infekcja wirusowa i utrzymujące się niedotlenienie

narządu mogły zaburzyć mechanizmy obronne. Prawidłowa błona śluzowa ucha środkowego składa się z komórek nabłonkowych urzęsionych, biorących udział w usuwaniu bakterii. Zostało udowodnione, że nabłonek w OME jest prawie całkowicie pozbawiony rzęsek, a ilość komórek wydzielniczych zwiększa się. Umieszczenie tubek wentylacyjnych jest efektywne w leczeniu OME dzięki rewentylacji przestrzeni ucha środkowego oraz zwiększenie natężenia tlenu, które potencjalnie zmienia fenotyp biofilmu. Odessanie wysięku po myringotomii rozrywa i zmniejsza biofilm. Rewentylacja, wskutek dotlenienia, przywraca mechanizmy obronne błony śluzowej ucha środkowego, ułatwia odrost nabłonka rzęskowego i redukuje ilość komórek wydzielniczych. Myringotomia z aspiracją płynu oraz założenie tubki wentylacyjnej jest świetnym sposobem na gromadzenie materiału do monitoringu mikrobiologicznego wysiękowego zapalenia ucha środkowego, który określiłby lokalne trendy oporności na pewne antybiotyki.

Chociaż OME jest często i z powodzeniem leczone za pomocą chirurgicznie zakładanych tubek wentylacyjnych, niekiedy zabieg ten jest powiązany z niepowodzeniem. Badania Post'a wykazały, że u 17% dzieci jakość życia po obustronnym założeniu tubek zmieniła się nieznacznie, a u 4% znacznie obniżyła się, głównie z powodu utrzymującego się wysięku [8]. Literatura przedmiotu wykazuje, że bakterie, poprzez mechanizmy adhezji, przywierają do różnorodnych implantów, co może stać się źródłem przewlekłej infekcji. Kilka prac prezentuje formację biofilmów na tubkach wentylacyjnych. Z tego powodu klinicyści nie są w pełni zadowoleni z istniejących terapii i poszukują ulepszonych metod leczenia opartych na naukowym zrozumieniu problemu. Sugestie określające obecność sterylnych procesów zapalnych powodujących OME wydają się być nieaktualne, a stwierdzana obecność endotoksyn i zapalnych cytokin może być wynikiem aktywnego procesu zapalnego, za który odpowiedzialne mogą być drobnoustroje wzrastające w postaci biofilmu. Potwierdzeniem hipotezy, że skupiska bakteryjne zwane biofilmami są odpowiedzialne za utrzymywanie się wysięku w uchu środkowym, były badania doświadczalne Post'a na hodowli szynszyli. Autor potwierdził obecność biofilmu za pomocą mikroskopu elektronowego po wprowadzeniu transtympanalnym *H. influenzae*. Koncepcja biofilmu może pomóc w rozwiązaniu wątpliwości związanych z patogenezą i leczeniem OME. Może dostarczyć odpowiedzi na pytanie, dlaczego wyniki hodowli są ujemne, gdy preparaty barwione metodą Grama, badania na

obecność endotoksyny oraz neuraminidazy, a także diagnostyka molekularna wykazują obecność bakterii w „sterylnych” wysiękach? Dlaczego mimo stwierdzanej obecności bakterii w leczeniu zawodzą antybiotyki? W jaki sposób wysięk utrzymuje się przez długi czas w przypadku braku żywych bakterii?

Bakterie biofilmu są trudne do wyhodowania metodą planktoniczną, są odporne na leczenie antybiotykami i stanowią preferencyjny fenotyp o znamionach niebolesnej, długofalowej obecności. Biofilmy w nosowej części gardła oraz w innych odcinkach drogi oddechowopokarmowej mogą powodować nawracające zaostrzenia zapalenia ucha środkowego. Badania kliniczne wykazały, że wycięcie migdałka gardłowego przynosi efekty w leczeniu ostrego zapalenia ucha, co może wiązać się z faktem eliminacji biofilmu.

Perspektywy terapii

Biorąc pod uwagę, że drobnoustroje w strukturach biofilmu są zdolne do porozumiewania się za pomocą określonych sygnałów określających ich liczebność „quorum sensing”, aktywacji genów odpowiedzialnych za wirulencję i regulują koordynację procesów życiowych w wytworzonych strukturach biofilmu, rozważane są całkiem inne możliwości terapeutyczne. Częstkami sygnalizacyjnymi w systemie „quorum sensing” są laktony N-acetyl-homoseryny (AHLs). Całkowity system sygnalizacyjny zawiera cząstki AHL, syntetazę cząstek sygnalizacyjnych typu LuxI, receptory dla odbioru sygnału LuxR i geny docelowe [13]. Stężenie tych sygnalizacyjnych cząstek pozwalających na wzajemne porozumiewanie się „cross-talk” drobnoustrojów w wytworzonej społeczności, odzwierciedla gęstość bakteryjnej populacji na określonej przestrzeni oraz indukuje, poprzez wewnątrzkomórkowy system sygnalizacji, ekspresję różnorodnych genów regulujących procesy metaboliczne, jak i wirulencje bakterii. Poznanie systemu cząstek sygnalizacyjnych pozwoli w przyszłości stworzyć nowe strategie w działaniu antybakteryjnym; byłyby to inhibitory syntezy AHL, czynniki hamujące rozprzestrzenianie się sygnału AHL i zahamowanie odbierania sygnału przez blokadę odpowiednich receptorów. Poznanie molekularnych procesów międzykomórkowego systemu sygnalizacyjnego w biofilmie daje szansę na alternatywne leczenie antybakteryjne nie tylko w przypadku wysiękowego zapalenia ucha środkowego, lecz również wielu innych postaci zakażeń o charakterze biofilmu. Ma to szczególne znaczenie w okresie narastającej oporności bakterii na antybiotyki i rozprzestrzenianiu się szczepów wieloopornych.

Piśmiennictwo

1. Radzikowski A, Dobkowska M, Bochenek K i wsp. Bakteryjne zapalenie ucha środkowego u dzieci w latach 1995-98. *Nowa Pediatria* 1999; 3(4): 9-11.
2. Wężyk MT, Małafiej E, Makowski A, Woch G. Bakteriologiczna ocena płynu z ucha środkowego w przebiegu OMS u dzieci. *Otolaryngol Pol* 2000; 54(5): 541-546.
3. Zielnik-Jurkiewicz B, Kolczyńska M. Flora bakteryjna w nawracającym ostrym zapaleniu ucha środkowego u dzieci. *Pol Merk Lek* 2005; 18(104): 146-150.
4. Dingman JR, Rayner MG, Mishra S, Zhang Y, Ehrlich MD, Post JC, Ehrlich GD. Correlation between presence of viable bacteria and presence of endotoxin in middle-ear effusions. *J Clin Microbiol* 1998; 36(11): 3417-3419.
5. Yellon RF, Doyle WJ, Whiteside TL, Diven WF, March AR, Fireman P. Cytokines, immunoglobulins, and bacterial pathogens in middle ear effusions. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995; 121: 865-869.
6. Maxwell K, Leonard G, Kreutzer DL. Cytokine expression in otitis media with effusion. Tumor necrosis factor soluble receptor. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 123: 984-988.
7. Himi T, Suzuki T, Kodama H, Takezawa H, Kataura A. Immunologic characteristics of cytokines in otitis media with effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992; 101: 21-25.
8. Post Ch. Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *Laryngoscope* 2001; 111: 2083-2094.
9. Post JC, Preston RA, Aul JJ, Larkins-Pettigrew M, Rydquist-White J, Anderson KW i wsp. Molecular analysis of bacterial pathogens in otitis media with effusion. *JAMA* 1995; 273: 1598-1604.
10. Post JC, White GJ, Aul JJ, Zavoral T, Wadowsky RM, Zhang Y, Preston RA, Ehrlich GD. Development and validation of a multiplex PCR-based assay for the upper respiratory tract bacterial pathogens *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Moraxella catarrhalis*. *Mol Diagn* 1996; 1: 29-39.
11. Cantekin EI. Bacterial DNA fragments in otitis media with effusion. *JAMA* 1996; 275(3): 186.
12. Pereira MB, Pereira MR, Cantarelli V, Costa SS. Prevalence of bacteria in children with otitis media with effusion. *J Pediatr (Rio J)* 2004; 80(1): 41-48.
13. Hentzer M, Giskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing from the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 2003; 112: 1300-1307.