

Biofilmit bakteeri-infektioissa

Tekijä: Salla Talvitie

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma

Ohjaaja: Joanna Koort

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto

Eläinlääketieteellinen mikrobiologia ja
epidemiologia

2014

Tiedekunta Eläinlääketieteellinen		Osasto Eläinlääketieteellinen biotiede	
Tekijä Salla Talvitie			
Työn nimi Biofilmit bakteeri-infektioissa			
Oppiaine Eläinlääketieteellinen mikrobiologia ja epidemiologia			
Työn laji Kirjallisuuskatsaus		Aika - Datum - Month and year 5/2014	Sivumäärä 54
Tiivistelmä			
<p>Bakteerit voivat kasvaa planktonisesti eli vapaana nesteessä tai ne voivat kasvaa kiinnittyneenä elolliseen tai elottomaan alustaan. Alustassaan kasvavia mikrobiyhteisöjä kutsutaan biofilmeiksi. Yli 99,9 % bakteereista kasvaa biofilmeissä. Biofilmi muodostuu mikrobeista, joita voi olla yhtä tai useampaa lajia. Bakteerit tuottavat ympärilleen soluväliainetta, joka koostuu erilaisista ekstrasellulaarisista polymeerisistä materiaaleista (EPS) kuten polysakkarideista, proteiineista ja DNA:sta.</p> <p>Biofilmit ovat huomattava ongelma ihmis- ja eläinlääketieteessä, sillä ne ovat osallisena noin 80 %:ssa kaikista ihmisten mikrobiologisissa infektioissa. Biofilmeissä kasvavat bakteerit ovat 10–1000 kertaa resistentimpiä kuin planktoniset bakteerit. Biofilmien resistenssimekanismeja ovat muun muassa heterogeenisyys (monimuotoisuus), lisääntynyt mutaationopeus, antimikrobisia aineita ulospumppaavat pumpit ja hidaskasvunopeus. Biofilmit on yhdistetty moniin vaikeasti parannettaviin infektioihin. Eläimillä ne ovat osallisina muun muassa haava- ja vierasesineinfektioiden, osteomyeliitin (luuydintulehdus), utaretulehduksen, keuhkotulehdusten ja monien muiden sairauksien taudinaiheutuksessa.</p> <p>Biofilmien diagnosointi on haastavaa, sillä perinteisillä osoitus- ja hoitomenetelmillä ei saavuteta hyviä tuloksia. Biofilmien diagnosointiin voidaan käyttää mikroskopointia, erilaisia värjäyksiä, viljelymenetelmiä ja DNA-pohjaisia menetelmiä. Näissä kaikissa on omat hyvät ja huonot puolensa.</p> <p>Biofilmien hoito on vaikeaa. Sen vuoksi on tärkeää kyetä ehkäisemään niiden muodostumista. Tärkein keino niiden ehkäisyssä on käyttää hoitotoimenpiteissä aseptisia menetelmiä, jolloin bakteerit eivät pääse kolonisoitumaan. Joskus voidaan käyttää antibiootteja biofilmien muodostuksen ehkäisyyn, sillä planktoniset bakteerit ovat herkkiä antibiooteille toisin kuin biofilmeissä kasvavat bakteerit. Antibioottien ehkäisevä käyttö voi kuitenkin suosia resistenttien bakteerikantojen kehittymistä. Vierasesineinfektioiden ehkäisyssä voidaan käyttää erilaisilla antimikrobisilla aineilla päällystettyjä vierasesineitä. Antibiootit eivät ole tehokas keino hoitaa biofilmejä. Niiden hoitoon voidaan käyttää mekaanista poistoa, lääkehunajaa tai erilaisia fysikaalisia menetelmiä kuten ultraääntä.</p>			
Avainsanat Biofilmi, bakteeri-infektio, eläinlääketiede			
Säilytyspaikka Eläinlääke- ja elintarviketieteiden (EE) -talon Oppimiskeskus			
Työn johtaja: Airi Palva Työn ohjaaja: Joanna Koort			

SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO	1
2	YLEISESITTELY	2
2.1	Mikä on biofilmi?	2
2.2	Biofilmin rakenne	3
2.3	Biofilmin muodostuminen	3
2.4	Biofilmit elimistössä	6
3	BIOFILMIEN RESISTENSSIMEKANISMIT	7
3.1	Heterogeenisyys ja horisontaalinen geenien siirtyminen	8
3.2	Effluksipumput	9
3.3	Mutaatiot	10
3.4	Hidas kasvunopeus	11
3.5	Isännän immuunipuolustuksen häirintä	11
3.6	Quorum sensing	12
3.7	Ekstrasellulaarinen polymeerinen materiaali (EPS)	12
4	BIOFILMIT ELÄINLÄÄKETIETEESSÄ	13
4.1	Haavainfektiot	13
4.2	Vierasesineinfektiot	14
4.2.1	Laskimokatetrit	14
4.2.2	Virtsakatetrit	16
4.2.3	Muut vierasesineinfektiot	17
4.3	Osteomyeliitti	18
4.4	Utaretulehdus	19
4.5	Suunterveys	21
4.6	Muita biofilmeihin liittyviä infektioita	22

5	BIOFILMIEN OSOITUSMENETELMIÄ	24
5.1	Diagnostiset menetelmät	25
5.1.1	Värjäys ja mikroskopointi	25
5.1.2	Viljelymenetelmiä	25
5.2	Tutkimuskäytössä olevat menetelmät	26
5.2.1	Läpäisy-, pyyhkäisyelektroni- ja konfokaalilaserpyyhkäisymikroskoopit	26
5.2.2	Putkimenetelmä	27
5.2.3	Kuoppalevy	27
5.2.4	Viljelymenetelmiä	29
5.2.5	DNA-pohjaiset menetelmät	29
5.3	Menetelmien vertailua	30
6	EHKÄISY JA HOITO	30
6.1	Ehkäisykeinot	30
6.1.1	Profylaksia	30
6.1.2	Aseptiikka	32
6.2	Hoitokeinot	33
6.2.1	Vierasesineen poisto	33
6.2.2	Antibioottien käyttö	33
6.2.3	Lääkehunaja	34
6.2.4	Fysikaaliset menetelmät	35
6.3	Tulevaisuuden lääkkeet	36
6.3.1	Quorum sensing inhibiittorit	37
6.3.2	Kuusenpihka	38
6.3.3	Effluksipumppuinhibiittorit	39
7	POHDINTA	39
7.1	Tavoitteiden arviointi	39
7.2	Tulevaisuuden haasteet	42

1 JOHDANTO

Tämä on kirjallisuuskatsaus biofilmeistä bakteeri-infektioissa. Työ on jatkoa kirjoittajan samannimiselle kandidaatintutkielmalle.

Biofilmit ovat bakteerien muodostamia yhteisöjä, joilla on monia resistenssimekanismeja (Donlan & Costerton 2002). Ne ovat huomattava ongelma ihmis- ja eläinlääketieteessä, sillä ne ovat osallisena noin 80 %:ssa kaikista ihmisten mikrobiologisissa infektioissa (Bordi & de Bentzmann 2011). Eläimillä biofilmit ovat osallisina muun muassa haava- ja vierasesineinfektioiden, osteomyeliitin (luuydintulehdus), utaretulehduksen, keuhkotulehdusten ja monien muiden sairauksien taudinaiheutuksessa. Biofilmien diagnosointi ja hoito on haastavaa, sillä perinteisillä osoitus- ja hoitomenetelmillä ei saavuteta hyviä tuloksia (Lynch & Robertson 2008).

Biofilmejä on tutkittu valtavasti monesta eri näkökulmasta. Eläinlääketieteellisiä tutkimuksia sen sijaan on melko vähän suhteutettuna kaikkiin biofilmeistä tehtyihin tutkimuksiin. Tämän vuoksi työn ensisijaisena tarkoituksena on kerätä yhteen eläinlääketieteellisesti keskeisimpiä biofilmien aiheuttamia bakteeri-infektioita. Toiseksi työllä halutaan korostaa biofilmien merkitystä sairauksien patogeenisissä (oppi sairauksien synnystä ja kehityksestä), sillä tällä hetkellä biofilmit ovat alidiagnostoituja. Tämä on aiheuttanut turhia sairastumisia, johtanut väärin diagnooseihin ja hoitokäytäntöihin, aiheuttanut eläinten hyvinvointiongelmia ja lisännyt taloudellisia kustannuksia. Kolmanneksi tarkoituksena on kertoa diagnostisista keinoista, koska biofilmejä ei voida osoittaa perinteisillä mikrobiologisilla viljelymenetelmillä. Työn neljäntenä tavoitteena on kertoa menetelmistä ja keinoista, joilla biofilmien aiheuttamia infektioita voidaan ehkäistä ja hoitaa.

Työssä pyritään ensisijaisesti tarkastelemaan biofilmejä eläinlääketieteelliseltä kannalta. Koska kaikista käsitellyistä osa-alueista ei kuitenkaan löydy kovinkaan paljon tutkittua eläinlääketieteellistä tietoa, on mukaan täydentämään otettu myös ihmislääketieteellisiä artikkeleita. Tässä työssä ihmislääketieteellisten tutkimusten tulosten perusteella on tehty oletuksia koskien myös eläinlääketiedettä.

2 YLEISESITTELY

2.1 Mikä on biofilmi?

Bakteerit voivat kasvaa nesteessä vapaana niin sanotusti planktonisesti tai ne voivat kasvaa kiinnittyneenä elolliseen tai elottomaan alustaan (Lynch & Robertson 2008). Jotta mikrobit pystyisivät tehokkaasti lisääntymään ja leviämään, tarvitaan planktonisia soluja. Kasvaessaan kiinteästi alustassaan mikrobiyhteisö on kestävä. (Clutterbuck ym. 2007.) Alustassaan kasvavia mikrobiyhteisöjä kutsutaan biofilmeiksi (Lynch & Robertson 2008). Lähes kaikki mikrobit (yli 99,9 %) kasvavat biofilmeissä (Donlan & Costerton 2002). Biofilmejä on hankala määritellä yksiselitteisesti, koska ne vaihtelevat suuresti rakenteeltaan, koostumukseltaan ja kasvuympäristöltään (Persival ym. 2011). Usein biofilmien määrittelyyn olevan toisiinsa ja alustaansa kiinnittyneitä hyvin monimutkaisia mikrobiologisia yhteisöjä, jotka ovat muodostaneet ympärilleen ekstrasellulaarisen polymeerisen materiaalin eli EPS:n (extracellular polymeric substance) (Costerton ym. 1999).

Biofilmejä on luultavasti ollut maapallolla yhtä kauan kuin on ollut bakteereitakin (Bjarnsholt 2013). Ensimmäisen kerran biofilmin lienee havainnut Anton van Leeuwenhoek 1600-luvulla. Hän huomasi mikroskoopissaan hammasplakkinsa sisältävän ”eläinkyylejä” (englanniksi animalcules), jotka olivat muodostaneet mikrobiyhteisöjä. (Bjarnsholt 2013, Costerton ym. 1999, Persival ym. 2011.) Kuitenkin vasta 1970-luvulla alettiin ymmärtää, että suuriosa mikrobibiomassasta muodostuu liikkumattomista biofilmimuodostelmista (Costerton ym. 1999).

Biofilmejä esiintyy kaikissa ympäristöissä (Persival ym. 2011). Ne voivat saada aikaan huomattavaa haittaa esimerkiksi teollisissa vesijärjestelmissä aiheuttamalla putkien korroosiota (Gomez-Alvarez ym. 2012). Biofilmejä voidaan hyödyntää muun muassa käyttämällä niitä jäteveden puhdistuksessa hajottamaan orgaanista materiaalia (Bjarnsholt 2013). Ihmisten ja eläinten elimistössä ne voivat olla patogeenisiä ja aiheuttaa vaikeasti parannettavia infektioita. Toisaalta ne kuitenkin muodostavat hyödyllistä mikrobistoa ihmisten tai eläinten ruuansulatuskanavissa. (Persival ym. 2011.) Jatkossa työssä biofilmillä tarkoitetaan ihmisestä tai eläimestä löytyviä biofilmejä, ellei erikseen toisin mainita.

2.2 Biofilmin rakenne

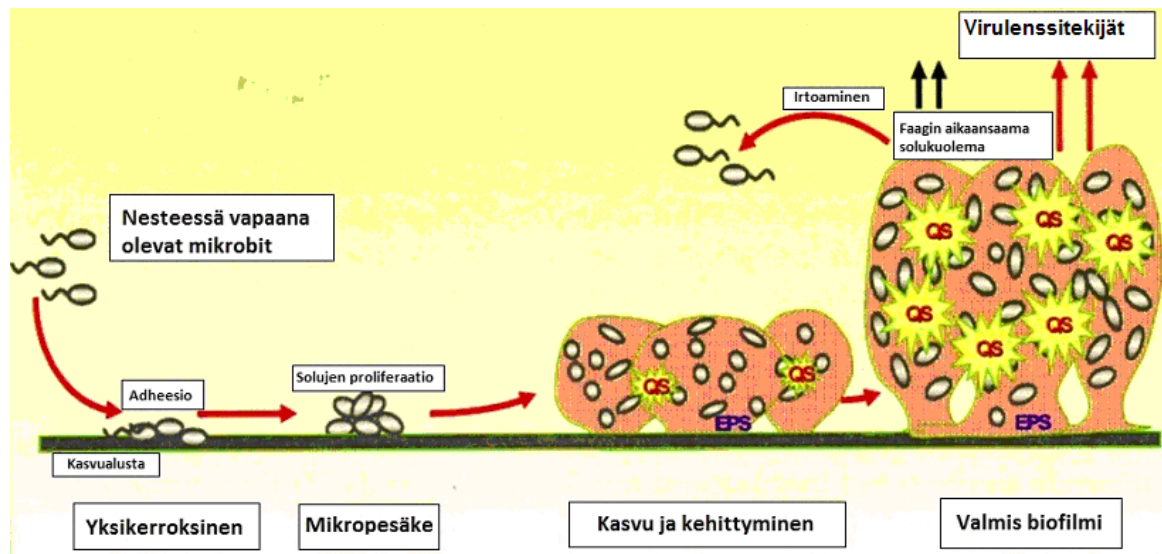
Biofilmi muodostuu mikrobeista, joita voi olla yhtä tai useampaa lajia (Donlan 2001, Thien-Fah 2012). Sekä gram-positiiviset että gram-negatiiviset bakteerit voivat muodostaa biofilmejä (Hassan ym. 2011). Bakteerit tuottavat ympärilleen soluväliainetta, joka koostuu erilaisista ekstrasellulaarisista polymeerisistä materiaaleista (EPS) kuten polysakkarideista, proteiineista ja DNA:sta (deoxyribonucleic acid) (Bjarnsholt 2013, Stoodley ym. 2002). Soluväliaineessa voi olla mukana myös ei-soluperäisiä materiaaleja, kuten mineraalikristalleja tai veren komponentteja (Persival ym. 2011). Valtaosa biofilmistä koostuu EPS:stä, sillä soluja biofilmissä on vain noin 15 % (Aslam 2008). EPS on biofilmille välttämätön rakenne, koska ilman sitä se ei voisi olla olemassa (Bjarnsholt 2013). EPS edistää biofilmin koossa pysymistä, lisää ravintoaineiden imeytymistä, ottaa kiinni mikrobisia tuotteita ja muita mikrobeja, suojaa liikkumattomia soluja ympäristön muutoksilta, tarjoaa väliaineen biofilmin sisäiselle kommunikaatiolle sekä välittää geneettistä materiaalia (Persival ym. 2011).

In vitro (koeputki) -olosuhteissa valmiiden biofilmien on usein havaittu kasvavan muodoltaan tornimaisiksi tai sientä muistuttaviksi (Høiby ym. 2010). *In vivo* (elävässä elimistössä) -olosuhteissa vastaavia kolmiulotteisia rakenteita ei ole havaittu (Bjarnsholt 2013). Biofilmin rakenteeseen vaikuttaa useita biologisia tekijöitä kuten kasvunopeus, solujen välinen kommunikointi, EPS:n tuotanto ja kasvuympäristö (Stoodley ym. 2002). Kaikki mikrobit eivät kuitenkaan muodosta biofilmejä yhtä helposti. Esimerkiksi *Pseudomonas aeruginosa* muodostaa biofilmejä helposti missä ympäristössä tahansa, mutta monet muut bakteerilajit vaativat erityisolosuhteita, kuten sopivan pH:n tai lämpötilan muodostaakseen biofilmejä. (Clutterbuck ym. 2007.)

2.3 Biofilmin muodostuminen

Biofilmin muodostuminen on dynaaminen prosessi, joka on riippuvainen ympäristöstä tulevista signaaleista. Biofilmin muodostus on melko samanlaista riippumatta sitä muodostavista mikro-organismeista. (Bordi & de Bentzmann 2011.) Valtaosa biofilmeistä tehdyistä hypoteeseista perustuu *in vitro* -malleihin. *In vitro* -olosuhteet eivät kuitenkaan vastaa monimutkaisia *in vivo* -olosuhteita, joten niitä ei voi suoraan verrata. Niistä voidaan kuitenkin vetää johtopäätöksiä ja ennakoida, kuinka biofilmit toimivat *in vivo*. Sen vuoksi tärkeimmät biofilmeihin liittyvät johtopäätökset ja oletukset pitäisi varmistaa kontrolloiduissa ja satunnaistetuissa olosuhteissa *in vivo* -

kokeissa. (Bjarnsholt 2013.) Seuraavaksi käsitellään biofilmin muodostumisen eri vaiheita (kuva 1).



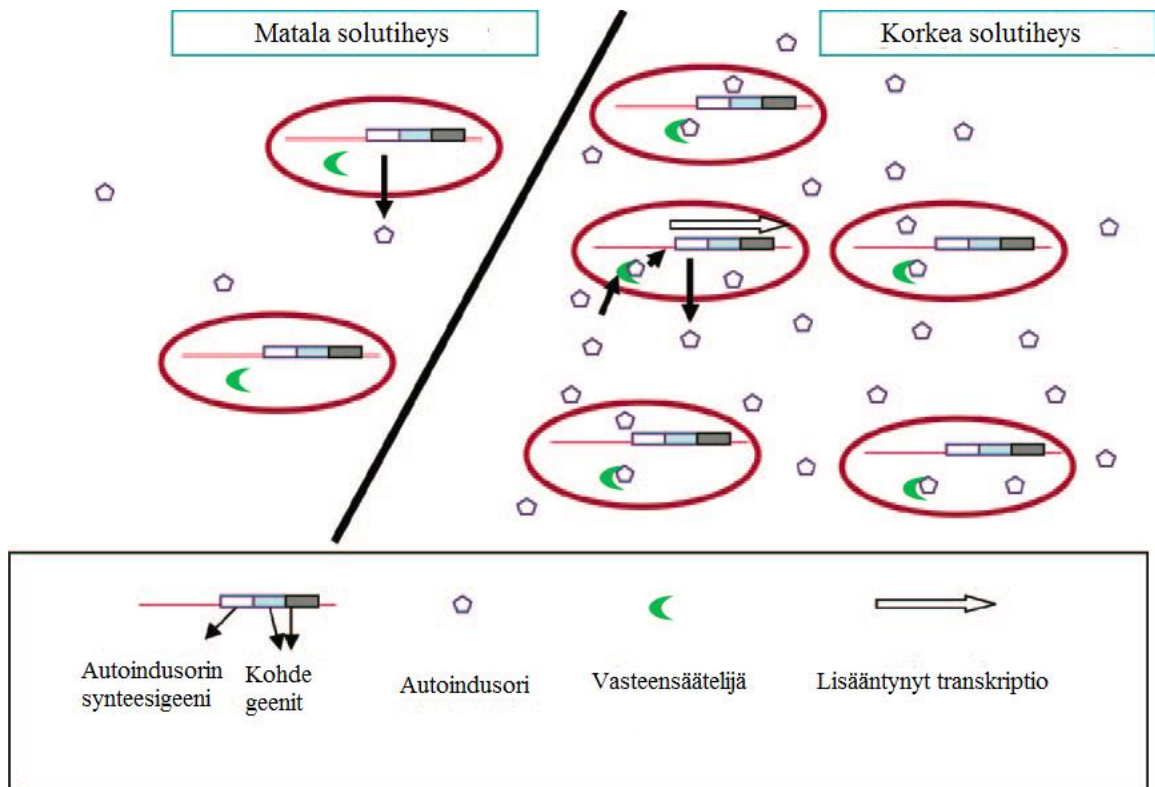
Kuva 1. Kaavamainen kuva biofilmin muodostumisesta *in vitro*. EPS (extracellular polymeric substance) on bakteerien ulkopuolelleen muodostama soluväliaine. QS (quorum sensing) kuvaa solujen välistä viestintää. Muokattu Høiby ym. mukaan (2010). Kuvaa on käytetty aikaisemmin Salla Talvitien kandidaatintutkielmassa Biofilmit bakteeri-infektioissa (2012).

Biofilmin muodostuminen *in vitro* -olosuhteissa voidaan jakaa karkeasti kolmeen vaiheeseen, jotka ovat **kiinnittyminen** (adheesio), **kasvu ja kehitys** sekä **hajoaminen** (Lappin-Scott & Bass 2001). **Kiinnittyminen** jakaantuu kahteen vaiheeseen; reversiibeliin ja irreversiibeliin. Kiinnittymisen ensimmäisessä vaiheessa yksittäiset planktoniset bakteerit uivat pitkin pintaa ja muodostavat ensimmäisen bakteerikerroksen. (Clutterbuck ym. 2007.) Tämä on niin sanottu reversiibelin kiinnittymisen vaihe, sillä solut voivat vielä irrota pinnasta ja jatkaa elämäänsä vapaana nesteessä (Stoodley ym. 2002). Bakteerien vaihtaessa planktonisen elämäntapansa biofilmiin *rsm*-geenit ovat tärkeässä asemassa (Bordi & de Bentzmann 2011). *Rsm*-geenit koodaavat sRNA:ta (small ribonucleic acid), jotka ovat bakteerien tuottamia, tärkeitä geenien säätelijöitä (Harris ym. 2013). Mikäli *rsmY*:n ja *rsmZ*:n ilmentäminen on voimakasta bakteerit alkavat muodostaa biofilmiä. Mikäli niitä ei ilmennetä, biofilmin muodostus on heikkoa. (Bordi & de Bentzmann 2011.) Kun alustaan on muodostunut ensimmäinen bakteerikerros, sen päälle alkaa kasaantua soluja ja ne muodostavat mikropesäkkeen (Clutterbuck ym. 2007). Kiinnittymisen seuraavassa

vaiheessa solujen ja pinnan välille muodostuneet heikot vuorovaikutukset muuttuvat pysyviksi sidoksiksi, eivätkä solut enää voi irrota alustastaan (Stoodley ym. 2002). Tämä on kiinnittymisen irreversiibelivaihe (Clutterbuck ym. 2007).

Pseudomonas -lajeja on käytetty paljon biofilmien muodostumisen malliorganismina (Caiazza & O'Toole 2004). Niiden avulla on löydetty useita eri geenejä, jotka kontrolloivat biofilmin muodostumista (Donlan & Costerton 2002). Esimerkiksi on havaittu, että ne *Pseudomonas fluorescens* -kannat, joilla on mutaatio *sad*-geenissä (surface attachment defective), eivät kykene muodostamaan biofilmiä (O'Toole & Kolter 1998). Lisäksi ne *P. aeruginosa* -kannat, joilla on toimimaton *sadB*-geeni, eivät pysty siirtymään kiinnittymisen reversiibelistä vaiheesta irreversiibeliin. Näin ollen ne eivät kykene siirtymään biofilmin muodostuksen seuraavan vaiheeseen, joka on kasvu ja kehittyminen. (Caiazza & O'Toole 2004.)

Kasvu- ja kehitysvaiheessa biofilmi alkaa muodostaa ympärilleen suojaavaa EPS:a (Clutterbuck ym. 2007). Tällöin biofilmiin alkaa muodostua vesikanavia ja muita sen monimutkaisen arkkitehtuurin rakenteita (Stoodley ym. 2002). Vesikanavat mahdollistavat metabolisten tuotteiden ja ravintoaineiden kiertämisen biofilmissä (Clutterbuck ym. 2007). Samalla biofilmi alkaa kasvaa kokoa (Stoodley ym. 2002). Solujen välinen signaalointi on tärkeässä asemassa biofilmin kasvussa ja kehityksessä. Keskeisessä asemassa solujen välisessä signaloinnissa on niiden quorum sensing -kyky. (Clutterbuck ym. 2007.) Termillä quorum sensing viitataan systeemiin, joka perustuu biofilmin solutiheydestä riippuvaan, solujen väliseen kommunikoituihin (Bjarnsholt 2013). Kun bakteerisoluja on vähän, solujen tuottamat autoindusorimolekyylit laimenevat ympäristöön (kuva 2). Solutiheyden kasvaessa autoindusorimolekyylejä kerääntyy solujen ympärille ja niiden sisään. Autoindusorimolekyylit aktivoivat transkription säätelyproteiineja ja sitoutuvat niihin. (González & Keshavan 2006.) Näin autoindusorien avulla solut havainnoivat ympäristöään, aistivat ja vastaavat lähellä olevien solujen viesteihin (Wolcott ym. 2012) sekä koordinoita geenien ilmentymistä (Høiby ym. 2010). Quorum sensing:n ajatellaan osallistuvan myös biofilmin paksuuden määrittelyyn (Quinn ym. 2011). Kun biofilmi on saavuttanut maksimipaksuutensa eli se on valmis, alkaa biofilmin kasvusyklin viimeinen vaihe; hajoaminen (Clutterbuck ym. 2007).



Kuva 2. Kaavamainen kuva bakteerin quorum sensing:stä. Solutiheyden ollessa matala autoindusorimolekyylit liukenevat nopeasti ympäristöön. Korkeassa solutiheydessä autoindusorimolekyylien määrä lisääntyy yli kynnysarvon, joka aikaansaa vasteensäätelyproteiinien aktivoitumisen. Vasteensäätelyproteiinit taas lisäävät transkriptiota. Muokattu Gonzalez & Keshavan mukaan (2006).

Hajoamisvaiheessa biofilmistä irtoaa soluja joko yksittäin tai ryhmissä. Tarkkaa syytä tapahtumalle ei tiedetä. (Stoodley ym. 2002.) Yksi teoria on, että biofilmi alkaa vapauttaa soluja siksi, että ne löytäisivät suotuisamman elinympäristön, silloin kun biofilmin ravinnonsaanti ei ole enää riittävää (Clutterbuck ym. 2007). Bakteerin irrottua biofilmistä, se palautuu jälleen planktoniseen kasvunvaiheeseen, jolloin biofilmin kasvuykli voi alkaa uudestaan (Stoodley ym. 2002). Elimistössä tapahtuvan biofilmien hajoamisen seurauksena biofilmin bakteerit pääsevät leviämään infektoituneesta kudoksesta muuhun elimistöön. Tämä mekanismi selittää sen, minkä vuoksi krooniset infektiot saavat toisinaan aikaan akuutteja verenkiertoinfektioita. (Bjarnsholt 2013.)

2.4 Biofilmit elimistössä

Hieman yllättäen biofilmit muodostuvat elimistössä usein paikkoihin, joissa on voimakas virtaus kuten sydänläppiin. Tällaisissa paikoissa olevat biofilmit ovat huomattavan vahvoja ja kestävät hyvin mekaanista rasitusta. Mikäli biofilmi on kehittynyt paikkaan, jossa on heikko virtaus, niissä on huono vetolujuus ja ne hajoavat

helposti. On epäilty, että turbulenttinen virtaus muuttaa bakteerien kiinnittymistä, jolloin planktoniset bakteerit tunkeutuvat väkisin kiinnittymispintaan. (Donlan & Costerton 2002.) Biofilmejä löytyy tyypillisesti myös kuolleista kudoksista, kuten osteomyeliitin (luuydintulehdus) seurauksena syntyneistä kuolleista luualueista, tai vierasesineistä (Costerton ym. 1999).

Biofilmien kasvu on usein hidasta ja niiden aiheuttamien infektioiden oireet tulevat esiin vähitellen ja ne ovat epämääräisiä (Bjarnsholt 2013). Tyypillisesti alkuperäinen infektio on vähäinen eikä yleensä aiheuta välitöntä hengenvaaraa (Wolcott & Ehrlich 2008). Biofilmin bakteerit voivat esimerkiksi vapauttaa antigeenejä, jotka saavat aikaan vasta-aineiden muodostuksen. Muodostuneet vasta-aineet eivät kuitenkaan kykene tuhoamaan biofilmiä. Vasta-aineiden ja antigeenien muodostamat immunokompleksit voivat sen sijaan aiheuttaa vaurioita ympäröiviin kudoksiin. (Costerton ym. 1999.)

3 BIOFILMIEN RESISTENSSIMEKANISMIT

Lääketieteessä biofilmeistä on käytetty hieman erilaista määritelmää kuin biofilmeistä yleensä. Niiden kuvataan olevan soluväliaineen sisällä olevien bakteerien ryväkäs, jotka sietävät paremmin useimpia antimikrobisia aineita ja isännän puolustusmekanismeja kuin planktoniset bakteerisolut. Tässä on kaksi puolta; toleranssi ja resistenssi. Toleranssilla tässä yhteydessä tarkoitetaan, että bakteerit eivät kuole, mutteivät myöskään pysty lisääntymään lääkkeen tai antimikrobisen aineen läsnä ollessa. Resistenssissä bakteerit pystyvät kasvamaan lääkkeen tai antimikrobisen aineen läsnäolosta huolimatta. (Bjarnsholt 2013.)

Biofilmeissä kasvavat bakteerit ovat 10–1000 kertaa resistentimpiä kuin planktoniset bakteerit (Melchior ym. 2005). Sen vuoksi edes yksilöt, joilla on erinomainen immuunipuolustus, harvoin pääsevät eroon biofilmi-infektioista oman vastustuskykynsä avulla (Costerton ym. 1999).

Biofilmit yhdistetään moniin erilaisiin infektioihin, jotka vastaavat huonosti perinteiseen antibioottihoitoon (Lynch & Robertson 2008). Tyypillisimpiä esimerkkejä hankalasti parannettavista biofilmeihin liittyvistä infektioista ovat vierasesine- ja haavainfektiot (Høiby ym. 2010). Biofilmeillä on useita eri resistenssimekanismeja, jotka toimivat yhdessä (Thien-Fah 2012). Eri organismeilla on jonkin verran toisistaan

poikkeavia resistenssimekanismeja (Aslam 2008). Seuraavassa käydään läpi joitakin näistä mekanismeista.

3.1 Heterogeenisyys ja horisontaalinen geenien siirtyminen

Biofilmit ovat bakteerilajistollisesti (Wolcott ym. 2012), kemiallisesti, fysiologisesti ja geneettisesti hyvin heterogeenisiä, mikä tekee niiden tuhoamisen hyvin vaikeaksi (Bordi & de Bentzmann 2011). Useita eri mikrobeja sisältävät biofilmit aiheuttavatkin vakavampia infektioita ja niitä on vaikeampi hoitaa. Vaikuttaa siltä, että biofilmit pyrkivät aktiivisesti kohti monimuotoisuutta lisätäkseen mahdollisuuksiaan säilyä hengissä. (Wolcott ym. 2012.)

Biofilmin kypsyessä sen solutiheys lisääntyy (Shunmugaperumal 2010a). Tällöin siihen muodostuu erilaisia metabolisia gradientteja, joissa ilmennetään eri geenejä (Thien-Fah 2012). Esimerkiksi hapen konsentraatio biofilmin pinnalla voi olla korkea, mutta biofilmin keskellä voi olla anaerobiset (hapettomat) olosuhteet. Tällöin muun muassa biofilmin proteiinisynteesi, metabolinen aktiivisuus ja kasvu muuttuvat kerroksittain siirryttäessä biofilmin pinnalta sen keskusta. (Høiby ym. 2010.) Näin biofilmistä löytyy useita erilaisia olosuhteita, jotka tarjoavat jokaiselle bakteerille jotakin (Costerton ym. 1999). Näin ollen vaikka osa bakteereista onnistutaan tuhoamaan yhdenlaisella suoralla metabolisella hyökkäyksellä, jää osa biofilmin soluista henkiin, sillä nämä vaativat toisenlaisen tuhoamisstrategian (Costerton ym. 1999). Tämä heterogeenisyys lisääntyy sitä mukaan mitä kauemmin biofilmi kasvaa (Bordi & de Bentzmann 2011). Monimuotoisuus ei rajoitu yksinomaan vain paikkaan, sillä eri ajankohtina ilmennetään eri geenejä (Thien-Fah 2012). Heterogeenisyyden vuoksi biofilmit ovat oiva paikka horisontaaliselle geenien siirtämiselle, jolloin resistenssigeenit pääsevät helposti leviämään eri bakteerilajien välillä (Bordi & de Bentzmann 2011). Horisontaalisen geenien siirtymisen säätelijänä toimii quorum sensing -järjestelmä (Wolcott ym. 2012), joka aktivoituu biofilmin solutiheyden kasvaessa (Shunmugaperumal 2010a).

Biofilmissä solut voivat yhdistää geneettiset varantonsa kaikkia hyödyttäväksi pooliksi. Tällöin jokaisen yksittäisen solun ei tarvitse itse pitää sisällään kaikkea hengissä pysymiseen tarvittavaa geneettistä materiaalia. (Wolcott ym. 2012.) Esimerkiksi *Streptococcus pneumoniae* -yhteisöissä yksittäinen bakteeri sisältää vain osan geeneistä, joita viljelmässä on (Donati ym. 2012). Jakamalla geenit kaikkien jäsenten kesken,

yksittäiset solut säästävät energiaa ja samalla yhteisöllä on kaikki geenit käytössään (Wolcott ym. 2012).

3.2 Effluksipumput

Effluksipumppuja (englanniksi efflux pumps) on kaikissa soluissa, niin eukaryooteilla (aitotumallisilla) kuin prokaryooteilla (alkeistumallisilla). Niiden tarkoituksena on pumpata ulos haitallisia aineita soluista. (Webber & Piddock 2003.) Effluksipumput ovat tärkeä resistenssimekanismi bakteereille, sillä bakteerit käyttävät pumppuja pumpatakseen ulos esimerkiksi antibiootteja (Pagès ym. 2005). On arvioitu, että noin 5-10 % bakteereiden geneistä tarvitaan aineiden kuljetukseen ja suuri osa koodaa juuri effluksipumppuja (Webber & Piddock 2003). Näitä pumppuja löytyy sekä gram-positiivisilta että -negatiivisilta bakteerilta, mutta avainasemassa ne ovat erityisesti gram-negatiivisten bakteereiden resistenssin muodostuksessa (Soto 2013). Osa bakteereiden effluksipumpuista poistaa selektiivisesti vain yhtä substraattia, kuten tetrasykliiniä, mutta osa kykenee poistamaan useisiin eri luokkiin kuuluvia antibiootteja. Tällöin puhutaan monilääkeresistenteistä pumpuista (multiple drug resistance, MDR). (Zechini & Versace 2009).

Prokaryoottien effluksipumput kuuluvat viiteen superperheeseen: ABC- (ATP binding cassette), MF- (major facilitator), RND- (resistance nodulation division), SMR- (small multidrug resistance) ja MATE- (multidrug and toxic efflux) kuljettajiin (Webber & Piddock 2003). ABC-kuljettajat käyttävät ATP hydrolyysia sysätäkseen ulos substraatteja (Pagès ym. 2005). ABC-kuljettajia löytyy sekä eukaryooteilta että prokaryooteilta. Bakteereissa ABC-kuljettajat kuljettavat valikoivasti substraatteja. Ne kuljettavat esimerkiksi aminohappoja, sokereita, metallikationeja, vitamiineja ja antibiootteja. (Zechini & Versace 2009.)

MF-kuljettajia löytyy pääasiassa gram-positiivisilta bakteereilta ja ne kuljettavat usein vain yhteen tai muutamaankin antibioottiluokkaan kuuluvia yhdisteitä (Zechini & Versace 2009). Yhdessä ABC-kuljettajien kanssa ne ovatkin tärkeimmät kuljettajat, joita gram-positiivisista bakteereista löytyy (Soto 2013).

RND-kuljettajia on lähinnä vain gram-negatiivisissa bakteereissa ja nämä ovat niiden tärkeimmät effluksipumput (Soto 2013). Ne pystyvät kuljettamaan ulos soluista hyvin monia eri antibioottiluokkiin kuuluvia yhdisteitä, antiseptisiä aineita, detergentejä ja väriaineita (Zechini & Versace 2009). Esimerkiksi *P. aeruginosa* -bakteeri on

luontaisesti hyvin resistentti monille antibiooteille, ja sillä on useita monilääkeresistenssipumppuja (MDR). MDR-pumput kuuluvat RND-kuljettajaperheeseen. Eniten tämän perheen jäsenistä on tutkittu MexAB-OprM-, MexCD-OprJ-, MexEFOprN- ja MexXY-pumppuja. Biofilmeissä MexAB-OprM-pumppu on vastuussa muun muassa tobramysiinin, gentamisiinin ja aztreonamin ulospumppauksesta. Sen sijaan MexCD-OprJ- ja MexEFOprN-pumput eivät ilmeisesti osallistu antibioottiresistenssin muodostamiseen biofilmeissä. Tästä on tosin olemassa ristiriitaista tietoa. (Soto 2013.)

SMR-kuljettajia löytyy vain bakteereista ja ne kuljettavat lipofiilisiä kationilääkkeitä. MATE-kuljettajat siirtävät osittain samoja molekyylejä kuin RND-kuljettejat. (Zechini & Versace 2009).

3.3 Mutaatiot

Useissa tutkimuksissa on havaittu biofilmien mutaatiofrekvenssin kasvavan oksidatiivisen stressin seurauksena (Conibear ym. 2009). Äärimmäisen tehokkaita mutaatioiden tuottajia ovat niin kutsutut mutaatiokannat, joissa on tapahtunut mutaatio DNA:n epäsopivuutta korjaavassa järjestelmässä (englanniksi mismatch repair system) tai DNA:n oksidatiivisia vaurioita korjaavassa järjestelmässä (Høiby ym. 2010). Kokeellisesti on *P. aeruginosa* biofilmeissä olevissa mikrokasaumissa havaittu mutaatiofrekvenssin olevan vähintään satakertainen mahdollisesti jopa 1800-kertainen, verrattuna planktonisiin *P. aeruginosa* soluviljelmiin. (Conibear ym. 2009). Conibear kumppaneineen (2009) huomasivat DNA:n lukukehystä muuttavien mutaatioiden (englanniksi frameshift mutations) tapahtuvan juuri biofilmin sisällä olevissa mikrokasaumissa eikä muissa biofilmin soluissa. Syitä, miksi biofilmeissä tapahtuu enemmän mutaatioita kuin planktonisissa soluissa, ei tiedetä varmuudella. On esitetty, että mutaatiokantoja on enemmän biofilmeissä, koska ne sopeutuvat hyvin. Toinen teoria on, että stressitekijät saavat aikaan niin paljon DNA-vaurioita, että mutaatiokannat syntyvät. Kolmas teoria epäilee mutaatiokantojen ja persistoivien (pysyä lujasti, jatkuvasti pysyvä, keskeytymätön) solujen välillä olevan jonkinlainen yhteys. (Kovacs ym. 2013.) Persistoivista soluista kerrotaan lisää kappaleessa 3.4 Hidas kasvunopeus.

Esimerkiksi bakteerien resistenssi β -laktaamiantibiootteja vastaan johtuu osittain mutaatiosta, joka saa bakteerin tuottamaan AmpC β -laktamaaseja (Høiby ym. 2010). β -

laktamaasit ovat entsyymejä, jotka kykenevät hajottamaan penisilliinejä ja kefalosporiineja ja näin ollen estämään niiden vaikutuksen (NetMot sanakirja 2013). Mutaatioiden seurauksena solujen effluksipumppujen aktiivisuus lisääntyy. Ne lisäävät biofilmin vastustuskykyä esimerkiksi aminoglykosideja ja fluorokinoloneja kohtaan. (Høiby ym. 2010.)

3.4 Hidas kasvunopeus

Yksi asia, joka parantaa biofilmin sietokykyä antimikrobisille aineille, on bakteereiden hidas kasvunopeus biofilmeissä (Persival ym. 2011). Hidas kasvu johtuu todennäköisesti ravintoaineiden, hapen ja muiden kasvuun tarvittavien aineiden puutteesta biofilmeissä (Bjarnsholt 2013).

Antibiootit kykenevät tuhoamaan yleisesti ottaen paremmin jakaantuvia soluja kuin jakaantumattomia (Melchior ym. 2005). Esimerkiksi penisilliini ja ampicilliini, jotka estävät bakteerin soluseinän synteesiä, eivät kykene tuhoamaan jakaantumattomia bakteereita (Persival ym. 2011). Tämän vuoksi biofilmin pinnalla olevat solut ovat herkempiä antibioottien vaikutukselle kuin biofilmin sisällä olevat, sillä sisällä olevien solujen jakaantumisasiivisuus on vähäisempi kuin pinnalla olevien (Bjarnsholt 2013). Jakaantumattomat bakteerit eivät kuitenkaan ole täysin antibioottien ulottumattomissa, sillä muun muassa aminoglykosidit ja fluorokinolonit pystyvät tuhoamaan jakaantumattomia bakteereita, joskin niiden teho on parempi jakaantuvia bakteereita vastaan (Melchior ym. 2005). Kuitenkin arviolta 0,1-10 % biofilmin soluista on niin sanotusti persitoivia eli hyvin pysyviä ja stabiileja, etteivät antibiootit pysty tuhoamaan niitä. Nämä solut toimivat alkuna uudelle biofilmille antibiootihoidon jälkeenkin. (Persival ym. 2011.)

3.5 Isännän immuunipuolustuksen häirintä

On useita melko huonosti tunnettuja keinoja, jolla biofilmi kykenee häiritsemään isännän immuunipuolustusta. Vaikuttaa siltä, että EPS:n polysakkaridit, kuten alginaatti, itsessään häiritsevät fagosyyttejä (syöjäsoluja, jotka sulkevat sisäänsä ja tuhoavat bakteereita ja muita vieraita kiinteitä kappaleita) niin, etteivät ne kykene hoitamaan tehtävänsä. (Clutterbuck ym. 2007.) Ilmiö tunnetaan nimellä turhautunut fagosytoosi. Fagosyytit kuitenkin pääsevät kontaktiin bakteereiden kanssa ja jopa tunkeutuvat biofilmiin. Jostain syystä ne eivät silti pysty tappamaan bakteereita. Biofilmin puolustusmekanismi vaikuttaisi olevan kemiallinen, koska biofilmin bakteerit voivat

tuottaa yhdisteitä, jotka vaurioittavat ja jopa tappavat eukarioottisoluja, kuten granulosityttejä (jyväsoluja, joiden päätehtävä on fagosytoosi). (Bjarnsholt 2013.) Biofilmin paikalle houkuttelemat fagosyytit itse asiassa stimuloivat biofilmiä tuottamaan lisää resistenttejä bakteereita jatkuvalla, tuloksettomalla hyökkäyksellään. Samalla fagosyyttien tuottamat entsyymit, jotka eivät kykene tuhoamaan biofilmiä, tuhoavat ympäröivää kudosta. (Clutterbuck ym. 2007.)

3.6 Quorum sensing

Quorum sensing on tärkeässä asemassa biofilmin kehityksessä, mutta myös antibioottiresistenssin kehittämisessä (Clutterbuck ym. 2007). Mekanismeja, joilla quorum sensing säätelee antibioottitoleranssia, ei kuitenkaan täysin ymmärretä (Bjarnsholt 2013). Quorum sensingin avulla bakteerit varmistavat, että ympärillä on tarpeeksi muita bakteereita, jotta on kannattavaa esimerkiksi alkaa tuottaa virulenssitekijöitä tai toksiineja. Quorum sensing säätelee virulenssitekijöiden kuten ekstrasellulaaristen entsyymien ja sellulaaristen lysiinien tuotantoa. Sellulaariset lysiinit toimivat suojaavana kilpenä fagosyyttejä vastaan. (Høiby ym. 2010.) Quorum sensingin on osoitettu säätelevän lisäksi effluksipumppuja. Vaikuttaisi siltä, että quorum sensing olisi jossain määrin riippuvainen effluksipumppuista tulevista signaaleista. Siksi effluksipumppujen aktiivisuus säätelee bakteereihin sisään- ja ulosmeneviä quorum sensing molekyyliä, jolloin sillä voi olla kauaskantoisia seurauksia biofilmin muodostumisessa. (Soto 2013.) On havaittu, että bakteerit, joissa ei ole toimivia quorum sensing säätelijöitä, ovat virulenssiltaan vähäisempiä (Clutterbuck ym. 2007).

3.7 Ekstrasellulaarinen polymeerinen materiaali (EPS)

Biofilmissä mikrobit tekevät ”yhteistyötä”, josta koko yhteisö hyötyy (Bordi & Bentzmann 2011). Esimerkiksi ihmisellä löydetyssä sekabiofilmissä *Candida albicans* -hiivan ja *Staphylococcus epidermis* -bakteerin välillä oli symbioottinen suhde, jossa sienen muodostama EPS suojeli bakteeria antibioottien vaikutukselta ja bakteerin tuottama EPS suojasi hiivaa hiivalääkkeitä (Lynch & Robertson 2008). EPS ei kuitenkaan pysty kovin hyvin estämään antibiootin tunkeutumista biofilmin sisään, joskin tämä riippuu antibiootista ja biofilmin muodostavasta bakteerilajista (Clutterbuck ym. 2007). Esimerkiksi fluorokinolonit tunkeutuvat helposti *P. aeruginosa* ja *Klebsiella pneumoniae* biofilmeihin, tetrasykliini diffundoituu nopeasti *Escherichia coli* biofilmeihin, mutta aminoglykosidit tunkeutuvat huonosti *P. aeruginosa* biofilmeihin. Tässä on kuitenkin eroavaisuuksia jopa saman lajin muodostamien biofilmien välillä.

(Bordi & de Bentzmann 2011.) EPS:n kykyä estää antibioottien tunkeutumista ei pidetä kovin tärkeänä resistenssimekanismina (Clutterbuck ym. 2007).

4 BIOFILMIT ELÄINLÄÄKETIETEESSÄ

Biofilmejä on kaiken kaikkiaan tutkittu valtavasti, mutta eläinlääketieteessä niitä on tutkittu suhteellisen vähän (Clutterbuck ym. 2007). Biofilmien arvioidaan olevan osallisena noin 80 %:ssa kaikista ihmisten mikrobiologisissa infektioissa (Bordi & de Bentzmann 2011).

4.1 Haavainfektiot

Haavojen paranemista voivat hidastaa monet eri tekijät kuten haavan ikä, immobilisaatio (liikkumattomuus), iskemia (paikallinen verenpuute, kudoksen hapettomuus), infektiot, malnutritio (virheravitsemus), anemia, jotkin krooniset sairaudet kuten diabetes tai syöpä, sekä jotkin lääkkeet, kuten kortikosteroidit ja muut immunosuppressiiviset (immuunivastetta heikentävät) lääkkeet (Sipponen ym. 2012). Biofilmien tiedetään olevan mukana kroonisissa, huonosti paranevissa haavoissa (Bjarnsholt 2013). Ihmislääketieteessä aiheesta löytyy lukuisia tutkimuksia, mutta eläinlääketieteellisiä tutkimuksia on melko niukasti. Tehdyt tutkimukset keskittyvät hevosten haavoista löydettyihin biofilmeihin.

Hevosten haavat infektoituvat herkästi, koska talliympäristössä on runsaasti kolonisoivia bakteereita. Hevosten huonosti paranevat haavat ovatkin tunnetusti taloudellinen ja hyvinvointiongelma. (Westgate ym. 2011a.) Hevosten haavat paranevat huomattavasti huonommin raajojen alaosissa kuin vartalossa. Raajojen alaosissa verenkierto on huonompi, mikä johtaa kudosten huonompaan hapettumiseen kuin vartalossa. Nämä seikat aikaan saavat sen, että mikrobeille muodostuu suotuisa elinympäristö. (Westgate ym. 2011b.) Toinen syy ongelmaan löytyi Freeman:n ja kollegoiden (2009) tutkimuksessa. He havaitsivat, että valtaosasta hevosten haavanäytteistä löytyi biofilmiä. Tämä tutkimus oli ensimmäinen, joka todisti biofilmien olemassaolon hevosten haavoissa. He lisäksi selvittivät, minkälainen bakteerien lajikirjo haavoista löytyy. He osoittivat biofilmien olemassaolon ottamalla haavoista biopsianäytteitä, jotka mikroskoipoitiin. Bakteerien lajikirjon määrittämiseen he käyttivät molekulaaresia tekniikoita. He huomasivat, että hevosten haavojen mikrobisto muistuttaa hyvin paljon ihmisten haavojen mikrobistoa. Tyypillisiä

löydöksiä olivat *P. aeruginosa*, *S. epidermis*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens* ja *Providencia rettgeri*.

Westgate kumppaneineen (2011a) tutkivat myös biofilmien esiintyvyyttä hevosten haavoissa ja tutkivat bakteerien lajikirjoa. Heidän tutkimuksessaan biofilmejä löytyi 61,5 %:ssa haavanäytteistä. Tutkimuksessa löydetty tyypilliset haavalöydökset olivat *P. aeruginosa* ja eri stafylokokkilajit. Kyseisten bakteerilajien löytyminen haavoista ei ole odottamatonta, sillä haavat kontaminoituvat helposti ympäristöstä tulevilla bakteereilla kuten *Pseudomonas aeruginosa* -bakteereilla tai iholta tulevilta bakteereilla kuten stafylokokkilajeilla (Clutterbuck ym. 2007).

Biofilmien tunnistaminen ja niiden biologian ymmärtäminen helpottaa vaikeasti parannettavien haavojen hoitoja ja edistää eläinten hyvinvointia (Westgate ym. 2011a). Biofilmien aiheuttamia haavainfektioita voi olla vaikea diagnosoida. Toisinaan sopivien diagnosointimenetelmien puutteesta johtuen biofilmi-infektoituneiden hevosten haavojen voidaan raportoida olevan infektoitumattomia, joka johtaa väärään hoitoon. (Westgate ym. 2011b.) Lisääntynyt tietämys biofilmi-infektioista johtaa toivottavasti antibioottien hyödyttömän ja epäasiallisen käytön vähenemiseen ja sitä myöden myös antibioottiresistenttien bakteerikantojen vähenemiseen. Hevosten kroonisten haavojen etiologia (taudinsyy) vaikuttaisi olevan samanlainen kuin ihmisten diabeettisissa haavaumissa, jonka vuoksi niitä voisi hyödyntää mallina ihmisten kroonisissa haavainfektioissa. (Westgate ym. 2011a.)

4.2 Vierasesineinfektio

Ihmislääketieteessä biofilmien muodostuminen vierasesineisiin kuten erilaisiin implantteihin ja katetreihin on huomattava ongelma (Lynch & Robertson 2008). Ne aiheuttavat infektioita, jotka lisäävät sairastuvuutta, kuolleisuutta ja sairaanhoidon kustannuksia. Sen vuoksi ihmislääketieteessä on tehty paljon tutkimusta aiheeseen liittyen ja kehitetty menettelytapoja, joiden tarkoituksena on ehkäistä esimerkiksi katetreihin liittyviä infektioita (O'Grady ym. 2011).

4.2.1 Laskimokatetri

Raad (1998) kertoi, että ihmisillä lähes kaikissa keskuslaskimokatetreissa kasvaa biofilmiä. Tarkasteltaessa katetreja pyyhkäisyelektronimikroskoopilla, niissä näkyi biofilmiä. Biofilmejä havaittiin kasvavan myös sellaisissa katetreissa, joiden kvantitatiivinen viljelytulos oli negatiivinen. Biofilmien muodostumista huomattiin jo

24 tunnin kuluttua katetrin laitosta. (Raad 1998.) Raad:n (1998) mukaan kuitenkin vain pieni osa näistä aiheutti verenkiertoinfektion. Tästä huolimatta katetrien aiheuttamat verenkiertoinfektiot ovat kolmanneksi yleisin sairaalaperäinen infektio tehohoidossa olleilla potilailla (Hooper ym. 2011).

Ihmisiltä laskimokatetreista tyypillisesti eristetyistä biofilmeistä löytyy *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. faecalis* ja *Candida albicans* (Donlan 2001). Mikäli biofilmissä on osallisen *C. albicans*, siinä on usein myös korkea kuolleisuus (Ramage ym. 2006).

Infektion aiheuttavat mikrobit ovat tavallisimmin peräisin potilaan tai hoitohenkilökunnan iholta (Ramage ym. 2006). Harvinaisempi leviämistapa on hematogeeninen eli verenkierron välityksellä tullut kontaminaatio potilaan muussa paikassa olevasta infektiosta (Raad 1998). Mahdollista, joskin harvinaista, on saada infektio kontaminoituneiden infuusionesteiden kautta (Ramage ym. 2006).

Geraghty kollegoineen (2009) huomasi tutkimuksessaan mikrobien kasvua 8 %:ssa (7/92) mikrobiologisesti tutkituista hevosten laskimokatetreista. Katetreissa kasvoi pääasiassa ympäröivien kudosten kommensaaleja bakteereja (normaalimikrobiston jäsen, josta ei koidu isännälle hyötyä eikä haittaa) kuten *Micrococcus*- ja *Staphylococcus*-lajeja, ulostekontaminantti *Enterobacteriaceae*-laji sekä yksi sienilaji *Mucor*. Lisäksi yhdestä katetrasta löytyi *Acinetobacter baumannii*, joka oli resistentti useille antibiooteille *in vitro*. Kyseisessä tutkimuksessa ei kuitenkaan otettu kantaa, olivatko edellä mainitut mikrobit biofilmejä muodostavia kantoja.

Vaneechoutte ym. (2000) huomasivat myös tutkimuksessaan hevosten laskimokatetreissa kasvavan *A. baumannii* -bakteeria. He arvelivat kuitenkin löydöksen olevan kyseisille hevosille melko merkityksetön. Artikkelissa ei otettu kantaa bakteerin biofilmin muodostuskykyyn.

Marsh-Ng ym. (2007) tutkivat katetreihin liittyviä infektioita tehohoidossa olleilla koirilla ja kissoilla. Kaiken kaikkiaan 24,5 %:sta viljellyistä katetrien kärjistä saatiin positiivinen tulos. Yleisin löydös viljelyissä oli jokin *Enterobacter*-laji. Tavallisia löydöksiä tutkimuksessa olivat myös *E. coli* ja *Pseudomonas*-lajit. Tutkimuksessa epäiltiin kuitenkin *Enterobacter* löydösten olevan valtaosaksi kontaminaatioita ihmisten käsistä. Tutkimuksessa etsittiin myös katetreihin liittyvien infektioiden altistavia

tekijöitä. Aikaisemmissa ihmisillä tehdyissä tutkimuksissa riskitekijöiksi on havaittu katetrien käsittely, sijainti, pitkä käyttöaika, verinäytteidenotto katettrin kautta, tiettyjen infuusionesteiden käyttö, tietty katetrityyppi ja katetroinnin aikainen laskimotulehdus. Marsh-Ng ym. (2007) tutkimuksessa ei kuitenkaan havaittu assosiaatiota edellä mainittujen asioiden ja positiivisen viljelytuloksen välillä. Kyseisessä tutkimuksessa ei myöskään pohdittu biofilmien muodostusta katetreihin. Ottaen huomioon, kuinka merkittävää biofilmin muodostus laskimokatetreissa on ihmisellä, voitaneen olettaa, että se on sitä myös eläimillä.

Edellä mainituissa tutkimuksissa katetreista löydetty bakteerit tukevat hyvin väitettä, että katetrikontaminaation lähteenä on tyypillisimmin iho. *Micrococcus*-, *Staphylococcus*- ja *Pseudomonas*-lajit ovat tyypillisiä ihon normaalimikrobiston jäseniä ja *E. coli* ja *Enterobacter*-lajit suoliston normaalimikrobistoa (Quinn ym. 2011). *A. baumannii* -bakteeri on mahdollinen riski ihmispotilaille moniresistenttinä bakteerina ja eläimet ovat sen potentiaalinen reservoaari (Endimiani 2011).

4.2.2 Virtsakatetrit

Katetreihin liittyvät virtsatieinfektiot ovat tavallisin sairaalaperäinen infektio ihmisillä (Hugonnard ym. 2013). Riski saada katetriperäinen bakteriuria (bakteerien esiintyminen virtsassa) kasvaa sen mukaan mitä kauemmin katetri on paikoillaan (Donlan 2001, Trautner & Darouiche 2004). Tämä ei kuitenkaan aina aiheuta kliinisiä oireita, eikä oireettomia katetrien aiheuttamia virtsatieinfektioita yleensä hoideta ihmisillä (Trautner & Darouiche 2004). Virtsakatetroinnin aiheuttamat virtsatieinfektiot lisäävät sairastuvuutta ja kuolleisuutta sekä ihmisillä että koirilla. Biofilmi voi muodostua virtsakatetriin jo joidenkin tuntien kuluttua sen laitosta. (Segev ym. 2013.)

Lähes puolet katetroiduista koirista saa virtsatieinfektion (Bubenik ym. 2007). Katetreihin liittyvien virtsatieinfektioiden ehkäisy on ollut hankalaa, sillä systeemisten antibioottien käytöllä ei ole ollut toivottua vaikutusta (Segev ym. 2013). Tämän vuoksi Segev kollegoineen (2013) tutkivat, vähentääkö klooriheksadiinilla päällystettyjen virtsakatetrien käyttö biofilmin muodostumista katetreihin. Tutkimuksessa havaittiin klooriheksadiinipäällysteen vähentävän huomattavasti biofilmin muodostumista katetreihin. Päällystettyjen katetrien käytöllä voidaan mikrobien torjunta kohdistaa juuri haluttuun paikkaan eikä tarvitse käyttää systeemistä antibioottilääkitystä. Kyseisessä tutkimuksessa yhdenkään koiran virtsaviljelystä ei saatu positiivista tulosta, mutta

katetrien biofilmeistä onnistuttiin eristämään *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus*-bakteeri sekä yhdestä katetrasta löytyi bakteerien sekakasvua. (Segev ym. 2013.)

Hugonnard ym. (2013) pilottitutkimuksessa havaittiin kolmasosalla (33,3 %) uroskissoista, jotka kärsivät alempien virtsateiden tukkeumasta, katetrointiin liittyvä virtsatieinfektio. Valtaosa tutkimuksessa havaituista bakteereista oli tyypillisiä kissojen virtsatieinfektioiden aiheuttajia kuten *E. coli* ja *Staphylococcus*-lajeja. Sekä *E. coli* (Wang ym. 2011) että *Staphylococcus*-lajit voivat muodostaa biofilmejä (Oliveira ym. 2006), mutta kyseisessä tutkimuksessa ei kerrottu olivatko bakteerit muodostaneet biofilmiä katetreihin vai ei.

Ihmislääketieteessä on havaittu, ettei biofilmi pelkästään aiheuta infektion vaaraa, sillä se voi myös aiheuttaa ongelmia tukkimalla katettrin (Donlan 2001). Esimerkiksi *Proteus*-suvun bakteerit ovat hyvin tehokkaita tukkimaan virtsakatetreita. Ne tuottavat ureaasi-entsyymiä, joka hajottaa virtsan urean ammoniumhydroksidiksi, joka nostaa virtsan pH:ta. pH:n nousu saa aikaan muun muassa struviitti- ja kalsiumoksalaattikiteiden muodostumisen katetriin. (Shaw ym. 2005.) Yhdessä biofilmin kanssa ne voivat tukkia virtsakatettrin kokonaan (Donlan 2001, Shaw ym. 2005). *Pr. vulgaris* ja *Pr. mirabilis* ovat opportunistibakteereita, jotka aiheuttavat koirilla ja hevosille virtsatieinfektioita (Quinn ym. 2011). Tämän perusteella voitaneen olettaa, että virtsakatetrien tukkeutumista tapahtuu myös eläimillä.

4.2.3 Muut vierasesineinfektiot

Ihmislääketieteestä löytyy paljon tietoa biofilmien aiheuttamista vierasesineinfektioista. Ne ovat huomattava ongelma katetrien lisäksi myös muissa lääketieteellisissä vierasesineissä, kuten sydämen keinoläpissä, sydämen tahdistimissa, piilolinsseissä, hammasimplanteissa, keino nivelissä, endotrakeaalisisissa letkuissa, neurokirurgisissa sunteissa, dialyysiin käytetyissä laitteissa ja monissa muissa. (Hooper ym. 2011, Ramage ym. 2006.) Eläinlääketieteen puolelta tietoa muista kuin katetreihin liittyvistä biofilmi-infektioista on vähän. Kuitenkin eläimille laitetaan esimerkiksi erilaisia implantteja kirurgisten operaatioiden yhteydessä, joten on perusteltua olettaa, että vastaavaa tapahtuu myös eläimillä.

Vierasesineet tarjoavat biofilmeille kasvualustan, josta voi olla seurauksena yleistynyt verenkiertoinfektio (Ramage ym. 2006). Biofilmin muodostumiseen vierasesineeseen

vaikuttaa useita tekijöitä. Vierasesineen pintamateriaalilla voidaan vaikuttaa mikrobien kiinnittymiseen. Yleisesti hydrofiilisiä materiaaleja pidetään huonompana kasvualustana mikrobeille kuin hydrofobisia. Samoin negatiivisesti varautuneet pinnat sopivat huonommin mikrobien kasvualustaksi kuin positiivisesti varautuneet. Lisäksi sileään pintaa mikrobien on vaikeampi kiinnittyä kuin karheaan. (Hooper ym. 2011.) Muuttamalla olosuhteita edellä mainituilla tavoilla biofilmille epäedullisiksi, voidaan estää biofilmin kehittyminen (Kasimanickam ym. 2013). Myös mikrobin omat ominaisuudet ja isännän puolustusmekanismit vaikuttavat biofilmin muodostumiseen (Raad 1998).

4.3 Osteomyeliitti

Osteomyeliitti eli luuydintulehdus on infektiivisten taudinaiheuttajien aikaansaama luun tulehdus, joka voi levitä luuytimeen, korteksiin (kuoriluuhun), periosteumiin (luukalvoon) ja luun ympärillä oleviin pehmytkudoksiin. Pelkkää luutulehdusta kutsutaan osteiitiksi. (Goodrich 2006.) Eniten eläinlääketieteellisiä osteomyeliittitutkimuksia löytyy hevosista.

Tulehdus voi saada alkunsa hematogeenisesti, traumaattisesti tai iantrogeenisesti (lääkärin aiheuttama, hoidosta johtuva) (Clegg 2011). Hematogeenisesti levinneitä infektioista tavataan pääasiassa septisillä varsoilla, traumaattiset infektiot ovat sekundaarisia seurauksia pisto- tai repeytymishaavoista ja iantrogeeniset infektiot ovat sekundaarisia seurauksia kirurgisista operaatioista (Goodrich 2006). Näitä kautta luuhun päässeet bakteerit kiinnittyvät luuhun ja tuottavat ympärilleen biofilmin, joka tekee niistä hyvin resistentin sekä isännän puolustusmekanismeille että antimikrobiselle hoidolle (Clegg 2011). Lyhyesti sanottuna osteomyeliittiä on vaikea hoitaa (Clegg 2011, Goodrich 2006).

Ihmisillä *S. aureus* on ylivoimaisesti tyypillisin biofilmin aiheuttaja osteomyeliitissä (Johansen ym. 2012). Muita ihmisten osteomyeliitin aiheuttajia ovat *E. coli*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. ja *Mycobacterium* spp. (Brady ym. 2008). Monet näistä taudinaiheuttajista löytyvät myös hevosten osteomyeliiteistä (Clegg 2011, Goodrich 2006). Vaikka biofilmien tiedetään olevan osallisena myös hevosten osteomyeliiteissä (Clegg 2011, Goodrich 2006), tutkimuksia, joissa olisi tehty osteomyeliiteistä löydettyjen biofilmibakteerien lajimäärityksiä, ei löytynyt.

4.4 Utaretulehdus

Utaretulehdus eli mastiitti on merkittävin sairaus maitokarjoissa, sillä se vaikuttaa eläinten terveyteen ja hyvinvointiin, voi johtaa lehmän kuolemaan, vähentää maidontuotantoa, huonontaa maidonlaatua, lisää terveydenhuoltokustannuksia ja nopeuttaa eläinten teuraaksi laittoa (Melchior ym. 2005). Tyypillisimpiä utaretulehdusten aiheuttajia ovat *S. aureus* ja koagulaasinegatiiviset stafylokokit eli KNS:t (Rumi ym. 2013). Sekä *S. aureus* että koagulaasinegatiivisilla stafylokokkeilla on kantoja, jotka muodostavat biofilmejä (Oliveira ym. 2006). Muita Suomessa tyypillisesti esiintyviä utaretulehduksen aiheuttajia ovat esimerkiksi *Streptococcus dysagalactiae*, *Streptococcus uberis* ja koliformitbakteerit ja *Corynebacterium bovis* (Pyörälä & Tiihonen 2005). Lisäksi *E. coli* aiheuttaa utaretulehdusta ja sillä on kantoja, jotka muodostavat biofilmejä (Melchior 2011). Biofilmit ovat luultavasti selitys sille, miksi vanhojen lehmien ja lehmien, joilla on korkea somaattisten solujen määrä maidossa, hoito usein epäonnistuu (Melchior ym. 2005).

S. aureus voi aiheuttaa kliinistä utaretulehdusta, jossa oireiden voimakkuus vaihtelee kohtalaisesta voimakkaaseen ja sijainiltaan paikallisesta systeemiseen. *S. aureus* aiheuttaa usein myös subkliinisiä (piileväoireisia) utaretulehduksia, jotka voivat jäädä persistoimaan. KNS:ja on perinteisesti pidetty vähäisinä patogeeneinä, koska ne eivät yleensä aiheuta vakava oireisia utaretulehduksia. (Taponen & Pyörälä 2009.) KNS:t ovat kuitenkin yleisimpiä subkliinisten utaretulehdusten aiheuttaja ja puolet niistä jää, *S. aureus* -bakteerin tavoin, persistoimaan utareeseen pitkiksi ajoiksi (Simojoki ym. 2012). KNS infektiot ovat opportunistisia ja ne ovat osa ihon ja limakalvojen normaalimikrobistoa (Rumi ym. 2013).

Biofilmiä muodostuksen arvellaan olevan yksi tärkeä keino, jolla utaretulehdusta aiheuttavat stafylokokit välttävät naudan immuunipuolustuksen ja voivat jäädä persistoimaan utareeseen (Simojoki ym. 2012). Sen vuoksi onkin tärkeää tutkia, pystyykö utaretulehduksen aiheuttava stafylokokki muodostamaan biofilmiä vai ei (Oliveira ym. 2006). Tietoa tarvitaan, jotta voidaan tehokkaasti hoitaa ja ehkäistä utaretulehduksia (de Castro Melo ym. 2013). Biofilmiä tuottavan kannan nopea havaitseminen on tarpeellista myös siksi, ettei biofilmi ehdi kehittyä valmiiksi. Valmiista biofilmistä alkaa irrota soluja, jotka voivat aiheuttaa uuden infektion. (Melchior ym. 2005.) Siksi tarvittaisiin helppo ja halpa menetelmä, jolla voitaisiin löytää biofilmiä tuottavat kannat (de Castro Melo ym. 2013).

Biofilmiä taudinaiheutuskyvyssä on tärkeitä tekijöitä, joita on tutkittu paljon. Niitä ovat biofilmin liman muodostus, adheesio ja tunkeutuminen isäntäsoluun (invaasio). Utaretulehduksessa infektion jälkeen bakteerit kiinnittyvät utareen epiteeliin. Suojautuakseen isännän immuunipuolustukselta bakteeri tuottaa ympärilleen ekstrasellulaarisia polysakkarideja tai tunkeutuu isäntäsoluun. Mikäli bakteeri pystyy välttämään isännän puolustusmekanismit edellä mainituin keinoin, on seurauksena joko ekstrasellulaarinen tai intrasellulaarinen (solunsisäinen) bakteeribiofilmi. (Melchior 2011.) Seuraavassa tarkastellaan lähemmin *S. aureus* -bakteerin taudinaiheutuskykyä.

S. aureus -bakteeri on pääasiassa ekstrasellulaarinen bakteeri, joka kiinnittyy utareen epiteelisolun (Melchior 2011). Stafylokokkien kiinnittymiskyky vaihtelee, mutta niistä *S. aureus* on tehokkain kiinnittymään epiteeliin (Pyörälä & Tiihonen 2005). Kiinnittymistä välittää MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) proteiiniperhe, jotka ovat stafylokokkien pinnalla. MSCRAMM proteiiniperheen jäsenet kykenevät sitomaan fibronektiinia, kollageenia ja fibrinogeenia. (Melchior 2011.) Muun muassa sen vuoksi stafylokokit pystyvät kolonisoitumaan edellä mainittuja proteiineja sisältäviin kohteisiin kuten verihyytymiin ja epiteelivaurioihin (Pyörälä & Tiihonen 2005).

Osa *S. aureus* -kannoista voivat olla myös solunsisäisiä bakteereja. Isäntäsolun sisälle tunkeutuminen tapahtuu kiinnittymisen jälkeen. (Melchior 2011.) Stafylokokkibiofilmiä kehittyminen on monimutkainen prosessi ja sen kiinnittymiseen ja muodostumiseen vaikuttavat monet ulkoiset ja bakteerin sisäiset tekijät (Rumi ym. 2013). Ulkoisia tekijöitä ovat esimerkiksi monet utaretulehdusmaidon komponentit, jotka voivat vaikuttavat biofilmin muodostumiseen. Muun muassa laktoferriinin konsentraatio nousee utaretulehdusmaidossa. Laktoferriini myös inhiboi stafylokokkien biofilmiä muodostusta. (Simojoki ym. 2012.) Laktoferriinin ajatellaan muuttavan bakteerien liikkuvuutta ja vähentävän bakteerien pintaan kiinnittymistä (Mancl ym. 2012). Onkin spekuloitu, että laktoferriini voi estää stafylokokkien biofilmiä muodostuksen utaretulehduksessa (Simojoki ym. 2012).

Bakteerin sisäisiä, biofilmiä muodostumisen vaikuttavia tekijöitä, ovat bakteerin geenit, joita seuraavaksi tarkastellaan tarkemmin. Monet näistä geneistä yhdistetään biofilmiä muodostukseen, mutta niiden tehtävää ei tiedetä tarkasti. Biofilmiä muodostukseen liittyviä genejä on esimerkiksi *icaA*, *icaD*, *bap* ja adheesiogeneit *cna*,

eno, *fnbA*, *fnbB*, *ebpS*, *clfA*, *clfB* ja *bbp*. (Simojoki ym. 2012.) Näistä *icaA*:lla ja *icaD*:llä on osoitettu olevan merkittävä rooli *S. aureus*- ja *S. epidermidis* -bakteereiden biofilmin muodostuksessa (de Castro Melo ym. 2013). (*S. epidermidis* on koagulaasinegatiivinen stafylokokki, kirjoittajan huomautus) Molekylaaritekniikoiden avulla on tunnistettu geenit, jotka vastaavat stafylokokkibiofilmin liman eksopolysakkaridien muodostuksesta. Näitä eksopolysakkarideja kutsutaan myös nimellä PIA (polysaccharide intercellular adhesin). (de Castro Melo ym. 2013.) PIA on tärkein komponentti biofilmin muodostuksessa (Rumi ym. 2013). Erityisesti *icaA* on vastuussa PIA:n koodaamisesta. Sen vuoksi *ica* operonin alueen etsimistä bakteerista voidaan käyttää biofilmikantojen tunnistuskeinona. (de Castro Melo ym. 2013.)

Bakteerin ympärilleen tuottamaan biofilmiin sitoutuu myös lehmän omia proteiineja kuten immunoglobuliineja. Tämä osaltaan vielä heikentää paikallisen immuunipuolustuksen kykyä tunnistaa ja tuhota biofilmi. Lisäksi *S. aureus* tuottaa α -toksiinia, joka usein aiheuttaa kuolioivan, kuolemaan johtavan utaretulehduksen. α -toksiini lienee *S. aureus* -bakteerin pahin virulenssitekijä. (Pyörälä & Tiihonen 2005.)

4.5 Suunterveys

Ensimmäisenä löydetty ja eniten tutkittu biofilmi ihmisillä on hammasplakki (Williams ym. 2011). Se koostuu suun bakteereista, EPS:sta ja syljen glykoproteiineista. Gramma plakkia sisältää jopa 100 miljardia bakteeria. (Niemic 2008.) Plakki aiheuttaa hammaskariesta ja periodontiitin eli hampaanvierustulehduksen (Williams ym. 2011). Periodontiitilla tarkoitetaan hammasta ympäröivien kudosten eli ikenen, hammasta ympäröivien ligamenttien, alveolaarisen luun ja hammasjuurta ympäröivän sementin tulehdusta (Niemic 2008, Williams ym. 2011). Periodontiitin on ajateltu aiheutuvan bakteerien lisääntyneestä määrästä plakissa. Toisen teorian mukaan se aiheutuu lisääntyneestä plakin ja hammaskiven määrästä. Kolmas teoria taas ehdottaa, että periodontiitin muodostuminen riippuu siitä, mitä bakteerilajeja plakissa on. (Niemic 2008.)

Periodontiitti on yleisin pieneläimillä diagnosoitu sairaus. 70 %:lla yli kaksivuotiaista kissoista ja 80 %:lla yli kaksivuotiaista koirista on periodontiitti. Samalla se on myös vähiten hoidettu eläinten terveysongelma. Valtaosalla se kuitenkin aiheuttaa vähän tai ei lainkaan kliinisiä oireita. (Niemic 2008.) Periodontiitti on vähitellen etenevä sairaus ja lopulta se johtaa hampaan irtoamiseen (Williams ym. 2011). Ennen hampaan irtoamista

se on aiheuttanut muita huomattavia ongelmia kuten fistelin muodostumisen suuhun, juuripaiseen, kroonisen osteomyeliitin tai systeemisiä ongelmia kuten nälkiintymisen, munuais-, maksa- tai sydäntulehduksen. (Niemic 2008.) Tuotantoeläimillä se lisäksi aiheuttaa taloudellisia tappioita. (Williams ym. 2011.)

Suun mikrobisto vaihtelee eri eläinlajeilla, johtuen muun muassa eläimen syömästä ravinnosta. Bakteerien määrä ja laji vaihtelee myös sen mukaan, missä osassa suuta bakteeri kasvaa. Esimerkiksi limakalvoilla bakteerit pystyvät kiinnittymään melko huonosti, koska limakalvojen epiteelisolut vaihtuvat nopeasti. Sen sijaan kovat pinnat kuten hampaat tarjoavat hyvän kiinnittymispinnan bakteerille. (Williams ym. 2011.) Plakissa on pääasiassa fakultatiivisesti aerobisia gram-positiivisia kokkeja tai sauvoja (Niemic 2008). Esimerkiksi *S. aureus* -bakteeria löytyy niin koirien, kissojen, hevosten, sikojen kuin ihmisten suusta (Williams ym. 2011). Kun suuhun alkaa muodostua tulehdusta, bakteerien kokonaismäärä kasvaa ja mikrobistossa alkaa olla enemmän gram-negatiivisia sauvoja (noin 50 %) ja anaerobisia lajeja (Niemic 2008). Tällaisia ovat esimerkiksi *Pasteurella multocida* -bakteeri ja *Fusobacterium*-lajit (Williams ym. 2011).

Eläinten suun mikrobiston tuntemus on tärkeää myös ihmisten terveyden kannalta, sillä eläinten puremat ovat huomattava kansanterveydellinen riski. On arvioitu, että esimerkiksi Australian väestöstä 2 % saa koiran pureman vuosittain. Puremien pääkomplikaatiot ovat pureman itsessään aiheuttama kudonvaurio, henkinen järkytys ja infektiot. (Dentle & Looke 2009.) Infektion riski ja vakavuus riippuu, monen muun tekijän kanssa, eläimen suun mikrobistosta (Williams ym. 2011).

4.6 Muita biofilmeihin liittyviä infektiota

Hengitystieinfektioita aiheuttavat monet eri bakteerit. Seuraavassa käydään läpi muutama bakteeri, joiden patogeneesiin on yhdistetty biofilmien muodostus. *Histophilus somni* kuuluu märehitijöiden normaalimikrobistoon ja se tyypillisesti löytyy genitaalialueelta tai hengitysteistä. Sen on osoitettu muodostavan biofilmejä sekä *in vitro* että *in vivo*. Tutkimalla kahta eri *H. somni* kantaa, on huomattu niiden välillä olevan eroja. Kanta 2336, joka on eristetty naudan pneumoniasta (keuhkokuume eli keuhkokudoksen tulehdus), on patogeenisempi kuin kanta 129Pt, joka elää kommensaalina bakteerina genitaalialueella. Kannan 2336 on havaittu muodostavan massiivisemmän ja paksumman biofilmin kuin kanta 129Pt. Tämän perusteella on

ajateltu biofilmin rakenteella olevan tärkeä merkitys bakteerin virulenssille ja kolonisaatiolle. Hengitysteissä elävä *H. somni* kanta 2336, pystyykin aiheuttamaan pneumonian lisäksi myös myokardiitin (sydänlihastulehduksen). *H. somni* muodostaakin sydänlihaksessa laajemmalle levinneen biofilmin kuin keuhkoissa. Muita bakteereja, jotka muodostavat biofilmiä pneumoniassa, ovat esimerkiksi *Pasteurella multocida* ja *Mannheimia haemolytica*. (Sandal ym 2010.)

Actinobacillus pleuropneumoniae on sikojen hengitysteissä esiintyvä patogeeni, joka aiheuttaa sioille nimensä mukaisesti pleuropneumonian (MacInnes 2010). Pleuropneumonialla tarkoitetaan keuhkopussin (pleuran) ja keuhkokudoksen tulehdusta (NetMot sanakirja 2014a). Bakteerin aiheuttama tauti vaihtelee akuuttista krooniseen, riippuen keuhkoihin päässeiden bakteerien määrästä, niiden serotyypistä ja isännän vastustuskyvystä. *A. pleuropneumoniae* muodostaa tyypillisesti biofilmejä. Erityisesti anaerobisissa oloissa biofilmin muodostus on korostunutta. Lisäksi on yksittäistapaus, jossa *A. pleuropneumoniae* oli aiheuttanut sioille osteomyeliitin. (MacInnes 2010.)

Streptococcus suis on sioilla maailmanlaajuisesti esiintyvä patogeeni, jota siat kantavat imusolmukkeissaan ja nenäontelossaan (Wang ym. 2011). Se aiheuttaa sepsistä (verenmyrkytys), aivokalvontulehdusta, nivelulehdusta ja bronkopneumoniaa (pesäkekeuhkokuume) (Quinn ym. 2011). Biofilmin muodostus on yksi bakteerin virulenssikeino. *Str. suis* -bakteerin tiedetään muodostavan myös zoonoottisia kantoja. (Wang ym. 2011.)

Tammojen kroonisessa endometriitissä (kohdun limakalvon tulehdus) aiheuttajana on tyypillisesti *P. aeruginosa* -biofilmi (LeBlanc 2010). *P. aeruginosa* on tehokas biofilmin tuottaja ja se on yhdistetty moniin biofilmi-infektioihin (Pye ym. 2013). Muita hevosen patogeeneja, jotka tuottavat biofilmejä ja joita on löydetty kohdusta, ovat *S. epidermidis*, *E. coli*, *Ent. cloacae* ja monet hiivat ja sienet. Nämä patogeenit aiheuttavat endometriitin tyypillisimmin vanhemmalle, useamman kerran varsoneelle tammelle kuin nuorelle, fertiilille tammalle. (LeBlanc 2010).

Korvatulehdus on tavallinen vaiva monilla eläinlajeilla ja sen aiheuttajia on lukuisia. Tässä käydään läpi joitain esimerkkejä. *P. aeruginosa* aiheuttaa korvatulehdusta sekä korvakäytävän tulehtuneita haavaumia, tekstissä jo aiemmin mainittujen infektioiden lisäksi. Yksi syy, miksi *P. aeruginosa* on yleisimpiä korvatulehduksen aiheuttajia, on se, että se kykenee muodostamaan biofilmiä missä hyvänsä olosuhteissa, jossa

bakteerien kolonisaatio on ylipäättään mahdollista. (Pye ym. 2013.) Stafylokokit kuuluvat ihon normaalimikrobistoon, mutta ne voivat myös aiheuttaa korvatulehduksia (Moreira ym. 2012). Moreira kollegoineen (2012) tutki koirien korvatulehduksista eristettyjä stafylokokkikantoja, joista 30 % tuotti biofilmiä. Tyypillisimmät biofilmejä tuottavat kannat heidän tutkimuksessaan olivat *Staphylococcus intermedius* ja *Staphylococcus simulans*. Monien muiden hiivojen tavoin myös *Malassezia pachydermatis* -hiiva aiheuttaa kroonista ja uusiutuvaa korvatulehdusta. Biofilmit saattavat olla syy siihen, miksi *M. pachydermatis* -hiivan aiheuttama korvatulehdus vastaa huonosti perinteisiin hoitoihin. Hiiva aiheuttaa myös kroonista dermatiittia (ihotulehdusta). (Figueredo ym. 2013.)

Clostridium botulinum aiheuttaa botulismia (Böhnel & Gessler 2010). Botulismia aiheuttaa bakteerin tuottama myrkky, joka saa aikaan voimakkaat hermosto-oireet ja usein kuolemaan johtavan hengityshalvauksen (Quinn ym. 2011). Botulismille herkkiä eläimiä ovat märehitjät, hevoset ja siipikarja (Böhnel & Gessler 2010). Siat ja lihansyöjät kestävät paremmin botulismia (Quinn ym. 2011). *C. botulinum* -bakteerin uskotaan tuottavan biofilmiä. Tämä selittäisi sen, miksi *C. botulinum* – bakteeria erittyy kuukausia antibioottiloidolla olleiden vastasyntyneiden ulosteisiin. (Böhnel & Gessler 2010.)

5 BIOFILMIEN OSOITUSMENETELMIÄ

Biofilmien diagnosointi on haastavaa (Lynch & Robertson 2008). Suurena ongelmana on muun muassa se, ettei ole olemassa käytännöllisiä näytteenotto- tai osoitusmenetelmiä, joilla voitaisiin osoittaa biofilmien olemassa olo *in vivo* (Bordi & de Bentzmann 2011). Bakteriologisten näytteiden ottoon käytetään perinteisesti vanupuikkoja, joilla voidaan ottaa näytteitä vain pinnallisista paikoista kuten haavoista. Syvemmällä sijaitsevista infektioista voidaan ottaa näyte biopsialla, mutta siinäkin on hankaluutensa. Bakteerit eivät ole välttämättä jakaantuneet tasaisesti infektiotalueelle ja on mahdollista, että ”sokkobiopsialla” ei onnistuta saamaan näytteeseen ollenkaan bakteereita. Nämä ongelmat korostuvat erityisesti kroonisten infektioiden kohdalla. (Bjarnsholt 2013.)

Usein biofilmit on diagnosoitu kliinisten oireiden, bakteremian (bakteerien ilmeneminen veressä) tai elimistön nesteistä tehtyjen viljelyjen perusteella (Lynch & Robertson 2008). Useasti näillä menetelmillä saadaan väärä negatiivinen tulos (Lynch &

Robertson 2008) tai niillä ei löydetä kaikkia patogeenejä, jotka ovat mukana infektion aiheutuksessa (Daeschlein 2013). Tämän vuoksi biofilmit ovat luultavasti alidiagnosoituja (Bordi & de Bentzmann 2011).

5.1 Diagnostiset menetelmät

Diagnostisesti on tärkeää saada osoitettua biofilmien olemassaolo tavalla tai toisella. Tähän tarkoitukseen on olemassa erilaisia värjäys-, mikroskopointi- ja viljelymenetelmiä.

5.1.1 Värjäys ja mikroskopointi

Erilaiset värjäykset ja niiden mikroskooppinen tarkastelu ovat perinteisiä biofilmin osoitusmenetelmiä. Värjäysten tekeminen ja niiden tarkasteleminen valomikroskoopilla kuuluu myös lähes kaikkien laboratorioiden tutkimusvalikoimaan. Monesti niillä saadaan vain kvalitatiivinen tulos.

Biopsianäytteistä voidaan tehdä histologia leikkeitä, joita voidaan värjätä eri värjäyksillä kuten gram-, hematoksyliini-eosiini- tai Massonin trikromivärjäyksellä. (Freeman ym. 2009.) Värjäyksessä saadaan näkyviin näytteen mahdollinen biofilmi ja erityisesti gram-värjäyksellä saadaan myös viitteitä siitä, mitä bakteereja biofilmissä on. Jos biopsia on otettu esimerkiksi haavan reunalta, se on ollut tekemisissä hapen kanssa. Tämän vuoksi anaerobiset bakteerit löytyvät biofilmin sisäosista, ja niitä voi olla vaikea havaita tällä menetelmällä. (Westgate ym. 2011b.) Histologisten näytteiden hyvänä puolena on se, että niitä voi tarkastella valomikroskoopilla (Freeman ym. 2009).

Katetriin ynnä muiden vierasesineiden biofilmin osoittamisen voidaan käyttää suoraa akridiinioranssi-värjäystä. Tämä on nopea tapa osoittaa, kasvaako katetrissa biofilmiä vai ei. Menetelmällä ei voi määrittää solujen tarkkaa määrää eikä sitä mitä lajeja ne edustavat. (Donlan 2001.) Coomassie briljanttisinisistä käytetään värjäämään *P. aeruginosa* biofilmejä. Se värjää sekä biofilmin bakteerit että EPS:n. Sen avulla voidaan erottaa biofilmiä muodostavat ja muodostamattomat kannat. (Westgate ym. 2011b.)

5.1.2 Viljelymenetelmiä

Perinteisiä mikrobiologisia viljelymenetelmiä ei voida käyttää biofilmien diagnosoimiseen (Bjarnsholt 2013), sillä biofilmin suojassa bakteerit ovat elossa mutta ei-viljeltävissä (Westgate ym. 2011b). Jotkin biofilmeissä mukana olevat bakteerilajit ovat sellaisia, joille ei edes ole viljelymenetelmiä (Daeschlein 2013).

Esimerkiksi katetrin kärkien viljelemiseen on olemassa useampi menetelmä (Donlan 2001, Raad 1998). Eräässä puolikvantitatiivisessa menetelmässä katetrin kärkeä pyöritellään ei-selektiivisellä viljelyalustalla (englanniksi roll-plate technique) (Raad 1998). Menetelmän heikkoutena on se, ettei sillä voida tutkia biofilmejä, jotka ovat katetrin luumenin sisäpinnalla. Menetelmän diagnostinen sensitiivisyys on huono. (Donlan 2001.)

Astetta paremmassa menetelmässä katetrissa oleva biofilmi irrotetaan äänienergian avulla, jolloin saadaan sekä katetrin sisä- että ulkopinnalla olevat bakteerit mukaan tutkimukseen (Raad 1998). Tällä kvantitatiivisella menetelmällä on havaittu, että 10^4 CFU/katetrinkärki (colony forming unit eli pesäkettä muodostavaa yksikköä) enteilee katetrin aiheuttamaa sepsistä. (Donlan 2001.)

Kummankin menetelmän huonona puolena on se, että katetri joudutaan ottamaan pois, jotta ne voidaan tutkia (Shunmugaperumal 2010b). Tämän ongelman ratkaisuksi on kehitetty harjamenetelmä, jossa katetrin sisään työnnetään pieni harja, joka irrottaa biofilmin (Raad 1998). Harjasta biofilmi irrotetaan äänienergian avulla kasvuliukseen ja viljellään (Shunmugaperumal 2010b). Tämän menetelmän herkkyys on 95 % ja spesifisyys 84 %. Menetelmän huonona puolena on se, että se aikaan saa bakteremian 6 %:lle potilaista. (Raad 1998.) Edellä mainituissa menetelmissä biofilmi pitää irrottaa alkuperäisestä kasvualustastaan ennen kuin se voidaan viljellä. Irrotuksessa solut voivat vahingoittua sillä seurauksella että solut ovat elossa, mutta niitä ei kyetä viljelemään. (Shunmugaperumal 2010b.)

5.2 Tutkimuskäytössä olevat menetelmät

Seuraavia menetelmiä käytetään pääasiassa biofilmien tutkimuksessa. Myös edellä mainittuja diagnostisia menetelmiä voidaan käyttää biofilmien tutkimuksessa. Kuoppalevymenetelmää, kongonpuna-agaria ja PCR:ta voidaan hyödyntää myös diagnostisesti jos halutaan selvittää, onko tutkittava kanta biofilmin muodostaja vai ei.

5.2.1 Lämpäisy-, pyyhkäisyelektroni- ja konfokaalilaserpyyhkäisy-mikroskoopit

Biofilmejä voidaan tutkia lämpäisy- tai pyyhkäisyelektronimikroskoopilla sekä konfokaalilaserpyyhkäisy-mikroskoopilla (englanniksi confocal laser scanning microscopy, CLSM). Näiden avulla on selvitetty muun muassa biofilmin rakennetta. (Donlan & Costerton 2002.) CLSM on nykyisin rutiinimenetelmä tutkittaessa biofilmejä (Shunmugaperumal 2010b). Se voidaan yhdistää myös FISH-menetelmään

(fluorescent in situ hybridisation), jossa fluoresoivien merkkiaineiden avulla saadaan syvällisempää tietoa biofilmeistä. CLSM:n etuna verrattuna pyyhkäisyelektronimikroskooppiin on se, että sen avulla pystytään tutkimaan biofilmiä pintaa syvemältä. Pyyhkäisyelektronimikroskoopilla nähdään ainoastaan biofilmin pinta, kun CLSM-mikroskoopilla nähdään aina kudokseen asti, johon biofilmi on kiinnittynyt. (Westgate ym. 2011b.) Pyyhkäisymikroskooppien huonona puolena on myös se, että niitä käytettäessä näytteeseen täytyy laittaa alkoholia tai muuta liuotinta, joka kuivattaa näytettä. Kuivuminen aiheuttaa artefaktoja ja vääristää näytteen todellista rakennetta. CLSM-mikroskoopit ovat hyvin kalliita (200 000 dollaria), mikä rajoittaa niiden hyödyntämisen tutkimuskäyttöön (Shunmugaperumal 2010b.)

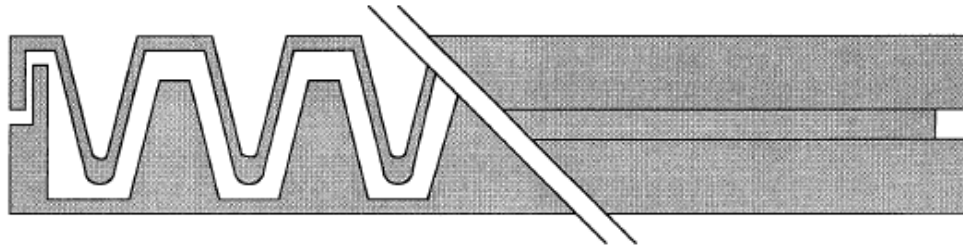
5.2.2 Putkimenetelmä

Putkimenetelmä oli ensimmäinen menetelmä, jolla voitiin makroskooppisesti arvioida bakteerien biofilmin muodostamiskykyä (de Castro Melo ym. 2013). Tässä menetelmässä tutkittava bakteeri ja kasvuliemi laitetaan koeputkeen. Putkea inkuboidaan, jonka jälkeen sen sisältö kaadetaan pois ja putki värjätään esimerkiksi trypan-sinisellä tai safraniinilla. Jos putkenseinämän sisäpinnalle on muodostunut limakerros, on tutkittava kanta biofilmin muodostaja. (Christensen ym. 1982, Christensen ym. 1985.) Biofilmin muodostuskyky arvostellaan asteikolla 0-4, jossa nolla tarkoittaa, ettei kanta muodosta biofilmiä ja neljä tarkoittaa, että kanta on voimakas biofilmin muodostaja (Christensen ym. 1985).

5.2.3 Kuoppalevy

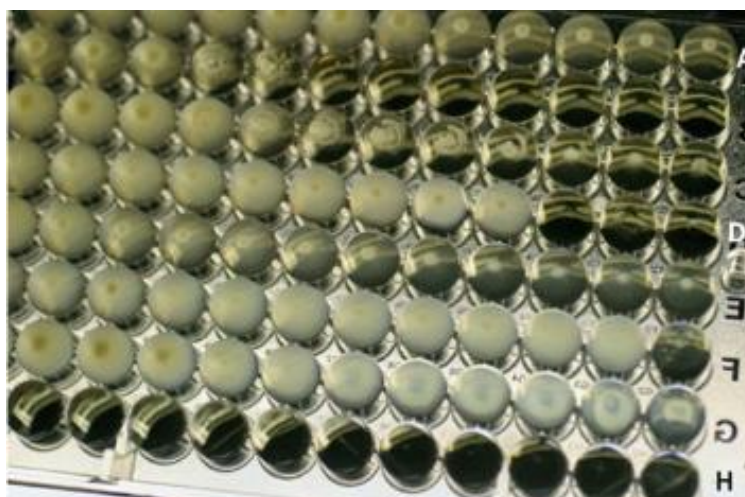
Kuoppalevyä eli mikrotiitterilevyä käytetään paljon biofilmien tutkimisessa (Shunmugaperumal 2010b). Tämä menetelmä tunnetaan nimellä TCP (Tissue Culture Plate) (de Castro Melo ym. 2013, Hassan ym. 2011). Menetelmä kehitettiin korvaamaan putkimenetelmä (de Castro Melo ym. 2013). Yksinkertaistaen tutkittava bakteeri laitetaan kasvamaan nestemäiseen kasvuliuokseen, joka pipetoidaan kuoppalevyille. Tämän jälkeen levyä inkuboidaan ja usein myös ravistellaan, jotta bakteerit kiinnittyisivät hyvin kuoppiin. Seuraavaksi kuoppiin laitetaan yleensä jotain väriä kuten kristalliviolettiä. Kuoppiin, joissa bakteerin kiinnittyminen on voimakkainta, kerääntyy eniten väriä. Kuopan optisen tiheyden kasvu voidaan mitata spektrofotometrillä. Näin saadaan kvantitatiivinen tulos. Elatusaineen koostumus, inkubaatioajat ja -lämpötilat sekä värjäykseen käytetty väri valitaan tutkimuskohteen mukaan. (Christensen ym. 1985, de Castro Melo ym. 2013, Hassan ym. 2011 ja Westgate ym. 2011b.)

Kuoppalevyn johdannainen on CBD-levy (Calgary Biofilm Device) (kuva 3), jolla voidaan tutkia antibioottien vaikutusta biofilmeihin. Se muodostuu kahdesta osasta. Sen pohja on kuoppalevy ja sen kannessa on tapit. Järjestelmä on rakennettu niin, että kasvuliuos pääsee virtaamaan koko levyssä, jolloin biofilmin muodostus on samanlaista joka puolella. On tärkeää, että biofilmien antibioottiresistenssin testaukseen saadaan yhdenmukaiset biofilmit, jottei epätasalaatuisuus aiheuttaisi tulosten vääristymää. (Ceri ym. 2001.)



Kuva 3. Poikkileikkaus CBD-levystä (Ceri ym. 1999).

Biofilmi muodostuu levyn kansiosaan ja kasvuliuos on pohjaosassa. Kun biofilmi on valmis, kansiosan tapit huuhdellaan kasvuliuksen ja planktonisten solujen poistamiseksi. Tämän jälkeen kansiosa siirretään normaaliin kuoppalevyyn, jonka kuopissa on antibioottia. Tällä koejärjestelyllä voidaan tutkia biofilmin MBEC-arvoa (minimum biofilm eradication concentration) (Ceri ym. 2001.) MBEC-arvo kertoo pienimmän lääkemäärän, joka tarvitaan biofilmin hävittämiseen (Westgate ym. 2011b). Biofilmin annetaan inkuboitua antibioottia sisältävässä kasvuliuoksessa. Kasvatuksen jälkeen biofilmi irrotetaan tapeista äänienergian avulla uuteen kuoppalevyyn. Siirrostuksen jälkeen voidaan kaivon optinen tiheys määrittää. (Ceri ym. 2001.) Niiden kaivojen sisältö on samaa, joiden antibioottipitoisuus ei ollut riittävä estämään bakteerien kasvua (Westgate ym. 2011b) (kuva 4).



Kuva 4. 96-kuoppalevyssä tehdyn MBEC-analyysin tulos. Kirkkaissa kuopissa, kuten osassa B, C ja D rivin kuopissa, antibiootti on estänyt bakteereiden kasvun. Sameissa kuopissa, kuten rivillä G, antibiootti ei ole kyennyt estämään bakteereiden kasvua. Rivi H sisältää kasvatusliuosta ilman bakteereita. (Westgate ym. 2011b)

5.2.4 Viljelymenetelmiä

Kuoppalevy menetelmän lisäksi on olemassa muitakin pääasiassa vain tutkimuskäytössä olevia viljelymenetelmiä, joilla tutkitaan bakteerien biofilmin muodostuskykyä. Kongonpuna-agarilla käytettäessä jaottelu perustuu EPS:n tuottamiseen. Kongonpuna-agarilla erotetaan biofilmiä muodostavat ja muodostamattomat *S. aureus* -kannat toisistaan. (Westgate ym. 2011b.) Biofilmiä muodostavien kantojen EPS saa bakteeripesäkkeet vaihtamaan värinsä agarilla punaisesta mustaan, kun taas biofilmiä muodostamattomien kantojen pesäkkeet pysyvät punaisena (de Castro Melo ym. 2013). Väri vaihto kertoo myös siitä, että kannalla on *icaA* ja *icaD* geenit, joiden esiintyminen korreloi limantuotannon kanssa. (Westgate ym. 2011b.) Kongonpuna-agarilla käytetään myös *S. epidermidis* -kantojen tutkimiseen (Freeman ym. 1989). Tämä ei ole kvantitatiivinen menetelmä, koska se perustuu subjektiiviseen värin muutoksen arviointiin (de Castro Melo ym. 2013).

5.2.5 DNA-pohjaiset menetelmät

DNA-pohjaisia menetelmiä on viime aikoina käytetty paljon tutkittaessa esimerkiksi genejä, jotka vastaavat biofilmin limaa tuottavien eksopolysakkarien koodaamisesta (de Castro Melo ym. 2013). Lisäksi niitä voidaan käyttää biofilmin bakteerien tunnistukseen (Wolcott ym. 2012). Keskeisiä tutkimusmenetelmiä ovat PCR (polymerase chain reaction eli polymeerasiketjureaktio) ja sekvensointi (de Castro Melo ym. 2013, Wolcott ym. 2012). PCR:n haasteena on se, että se löytää tutkittavan kohteen

vain silloin kun käytössä on juuri oikeanlainen aluke. Alukkeen suunnitteleminen on ensiarvoisen tärkeässä asemassa käytettäessä PCR-menetelmää. DNA-pohjaiset menetelmät tulevat olemaan jatkossa merkittäviä diagnostisia tunnistuskeinoja. (Wolcott ym. 2012.)

5.3 Menetelmien vertailua

de Castro Melo ym. (2013) vertailivat kongonpuna-agin, TPC-menetelmän ja PCR:n kykyä tunnistaa tunnetut biofilmiä muodostavat *S. aureus* -kannat. PCR:ssä etsittiin biofilmin muodostumiseen liitettyjä *icaA* ja *icaD* geenejä. Tutkimuksessa havaittiin, että kongonpuna-agarilla tunnistettiin 85 %, TPC-menetelmällä 98,9 % ja PCR:lla 95,7 % biofilmejä tuottavista kannoista. Hassan ym. (2011) puolestaan vertailivat TPC-menetelmän, putkimenetelmän ja kongonpuna-agarin kykyä tunnistaa biofilmiä muodostavat kannat. Tässä tutkimuksessa TPC-menetelmä oli paras ja kongonpuna-agarin huonoin. Yhteenvedon näiden tutkimusten perusteella voisi todeta, että biofilmin muodostumista tutkittaessa kannattaa käyttää joko TPC-menetelmää tai PCR-menetelmää, jolla etsitään *icaA* ja *icaD* geenejä. Putkimenetelmä ja kongonpuna-agarin sopivat täydentäviksi menetelmiksi.

6 EHKÄISY JA HOITO

Akuuttien infektioiden ajatellaan olevan planktonisten bakteerien aikaansaannos, joita hoidetaan yleensä antibiooteilla. Biofilmit taas liittyvät kiinteästi kroonisiin infektioihin, eikä niitä pystytä hoitamaan tehokkaasti antibiooteilla. (Bjarnsholt 2013.) Hoidon tehokkuus tosin riippuu siitä kuinka nopeasti tila diagnosoidaan, miten hyvin diagnoosi osuu kohdalleen ja kuinka hyvin infektion patogeenesi tunnetaan. (Bjarnsholt 2013, Raad 1998.) Biofilmien hoidon haasteena on niiden monet resistenssimekanismit. (Bordi & de Bentzmann 2011). Sen vuoksi paras keino taistelussa biofilmejä vastaan on ehkäistä niiden muodostuminen (Bjarnsholt 2013). Biofilmien muodostumisen ehkäisy on kaikin puolin järkevää, koska se parantaa potilaan hoitotulosta vähentäen sairastuvuutta, kuolleisuutta ja taloudellisia kustannuksia (O'Grady ym. 2011).

6.1 Ehkäisykeinot

6.1.1 Profylaksia

Profylaksialla tarkoitetaan (ennalta)ehkäisyä (NetMot sanakirja 2014b). Antibiootteja käytetään toisinaan profylaktisesti esimerkiksi ennen kirurgisia operaatioita (Høiby ym.

2010) sekä veri- ja virtsakatetrisonnin yhteydessä (Hugonnard ym. 2013, O'Grady ym. 2011). Profylaktisesti annettujen systeemisten antibioottien tarkoituksena on tuhota planktoniset solut ja estää biofilmin muodostuminen (Bjarnsholt 2013). Profylaktisesti käytetyistä systeemisistä antibiooteista hyödyistä ei ole kiistatonta näyttöä (Hugonnard ym. 2013). Niiden käyttö voi jopa suosia sellaisten kantojen kasvua, jotka muodostavat biofilmejä (Westgate ym. 2011a) tai muuten lisätä bakteerien resistenssiä (Hugonnard ym. 2013). Sen vuoksi Hugonnard ym. (2013) sekä Trautner & Darouiche (2004) ovat sitä mieltä, ettei systeemistä mikrobilääkitystä tulisi käyttää rutiinikäytäntönä ainakaan virtsakatetrointien yhteydessä. Sama suositus koskee myös verikatetreja (O'Grady ym. 2011).

Profylaksiaksi luetaan myös katetrien ynnä muiden vierasesineiden päällystämisen antibakteerisilla aineilla kuten klooriheksadiinilla (Segev ym. 2013), hopeaioneilla (Segev ym. 2013, Tran & Webster 2013) tai seleenillä (Tran & Webster 2013). Päällystetyt vierasesineet vapauttavat paikallisesti antimikrobisia aineita ja estävät bakteerien kolonisaation. Jos päällystyksessä on käytetty antibiootteja, saadut tulokset eivät ole pelkästään hyviä, sillä ne eivät ole estäneet esimerkiksi metisilliiniresistentin *Staphylococcus aureus* -bakteerin (MRSA) kasvua ja saattavat jopa suosia näiden kantojen muodostumista. Näistä syistä antibioottien käyttöä päällysteaineena vältetään. Hopeaa on käytetty päällysteaineena monissa vierasesineissä joko sellaisenaan tai yhdistettynä muihin aineisiin kuten klooriheksadiiniin. (Tran & Webster 2013.) Hopean käytöstä on saatu hyvin ristiriitaisia tuloksia (Segev ym. 2013, Tran & Webster 2013). Joidenkin tutkimusten mukaan se estää bakteerin kasvua hyvin, toisten tutkimusten mukaan huonosti. Lisäksi hopean käyttö päällysteaineena on kallista. Seleenin puolestaan on halpa raaka-aine ja sillä on saatu lupaavia tuloksia antimikrobisena päällysteaineena, mutta aihetta pitää tutkia vielä lisää ennen kuin tuloksia voi yleistää. (Tran & Webster 2013.)

Profylaksiaa on myös kirurgisten kohteiden huuhtelu antimikrobisilla aineilla ja antimikrobioottinen lukkoahoito (Lynch & Robertson 2008). Antimikrobioottisessa lukkohoidossa katettrin sisään laitetaan korkeasti konsentroitunut bakteriosidinen (bakteereita tuhoavia) antimikrobioottinen aine niin, että aine täyttää koko katettrin luumenin (Bordi & de Bentzmann 2011). Tämän jälkeen katetri on ”lukittu” siksi ajaksi kun sitä ei tarvita. Menetelmällä pyritään estämään luumenin kolonisoituminen. (Lynch & Robertson 2008.) Lukkohoidon tehosta ei ole kiistatonta näyttöä, sillä hoidon tehoa

on perusteltu negatiivisilla viljelytuloksilla. Kuitenkin tiedetään, ettei negatiivinen viljely tulos ole tae katettrin kolonisoitumattomuudelle. Hoidossa suositellaan käytettäväksi antimikrobisia aineita suurilla annoksilla, joka voi olla toksinen riski potilaalle (Bordi & de Bentzmann 2011) ja voi aiheuttaa sekundaarista resistenssiä mikrobeille (Raad 1998). Joidenkin yhdisteiden kuten taurolidiinisitraatin ja etanolin osalta lukkohoidon tulokset ovat kuitenkin lupaavia (Bordi & de Bentzmann 2011).

Yksi ihmisillä päivittäinen käytössä oleva keino ehkäistä biofilmien muodostumista on hampaiden pesu (Bjarnsholt 2013). Hampaiden harjausta tai erilaisten hampaita puhdistavien puruluiden käyttöä suositellaan myös kissoille ja koirille. Mikäli plakki ja hammaskivi eivät kotikonstein pysy kurissa, voidaan kissan ja koiran hampaat puhdistaa eläinlääkäriin toimesta. Näin vältetään periodontiitin aiheuttamilta ongelmilta. (Correl 2000.)

6.1.2 Aseptiikka

Tärkein keino biofilmien muodostuminen ehkäisyssä on aseptiikka eli menettelytavat joiden avulla pyritään toimimaan mikrobittomasti (Aslam 2008). Tämän vuoksi kaikissa invasiivisissa toimissa pitäisi noudattaa äärimmäistä puhtautta (Bjarnsholt 2013). Erityisesti katetreihin liittyvien infektioiden ehkäisystä löytyy paljon tietoa (O'Grady ym. 2011, Trautner & Darouiche 2004).

Invasiivisia toimenpiteitä tekevien henkilöiden pitää olla hyvin koulutettua ja ymmärtää toimenpiteisiin liittyvät riskit ja kuinka ne voidaan välttää (O'Grady ym. 2011). Ensiarvoisen tärkeää on noudattaa hyvää käsihygieniaa (Trautner & Darouiche 2004). Tähän kuuluu käsienpesu ja desinfiointi ennen toimenpiteen suorittamista (O'Grady ym. 2011). Tarpeen mukaan on käytettävä myös steriilejä hanskoja (Trautner & Darouiche 2004). Tarvittaessa pitää käyttää myös muita suojavarusteita kuten suusuojusta (O'Grady ym. 2011).

Invasiivisissa toimenpiteissä pitää välttää bakteerien viemistä ympäristöstä, välineistä tai iholta elimistöön (O'Grady ym. 2011). Esimerkiksi kirurgisia operaatioita tehdessä leikkaussalien on oltava ehdottoman puhtaita ja välineiden steriilejä (Bjarnsholt 2013). Myös ihon puhdistus on tärkeää (O'Grady ym. 2011), sillä infektion aiheuttaja on yleensä peräisin potilaan tai hoitajan iholta (Ramage ym. 2006).

Vierasesineiden kuten katetrien laittoa tai muiden invasiivisten toimenpiteiden tekemistä tulisi harkita tarkasti. Esimerkiksi katetrien laittoa vain varmuuden vuoksi tulisi välttää. (O’Grady ym. 2011.) Vieraseineet tulisi ottaa pois heti kun niitä ei enää tarvita (Trautner & Darouiche 2004).

6.2 Hoitokeinot

6.2.1 Vierasesineen poisto

Vierasesineinfektioiden hoito on hankalaa ja usein ainoa tehokas hoito on vierasesineen poistaminen tai vaihtaminen (esim. keinoläppä tai tekonivel, jonka kuuluisi jäädä elimistöön) (Lynch & Robertson 2008). Tämä ei aina kuitenkaan ole mahdollista johtuen esimerkiksi esineen anatomisesta sijainnista, potilaan huonosta kunnosta tai perussairaudesta (Ramage ym. 2006). Vaikka infektoituneen vierasesineen poistaminen olisi mahdollista, se aiheuttaa huomattavia kustannuksia. Esimerkiksi ihmisellä infektoituneen sydämen keinoläpän vaihtaminen maksaa 50 000 dollaria (noin 37 000 euroa). (Lynch & Robertson 2008.)

Vierasesineet, kuten katetrit tai haavassa oleva hiekka, karvat tai muu sinne kuulumaton aines, aiheuttavat ongelmia (Clutterbuck ym. 2007). Katetri-infektioissa hyviin tuloksiin päästään usein jo pelkällä katetrin poistolla (Trautner & Darouiche 2004). Haavainfektioissa oleellisena asiana on haavan puhdistus, jolloin päästään vierasesineiden lisäksi tehokkaasti eroon myös mikrobeista ja niiden tuottamista toksiineista sekä muista kudosta tuhoavista entsyymeistä ja nekrotisoituneesta kudoksesta (Daeschlein 2013).

Vierasesineet lisäävät patogeenien vaikutusta (Daeschlein 2013). Jos haavassa on vierasesineitä, sen infektiin tarvittava bakteerimäärä vähenee kymmenesosaan. Eli jos haavan, jossa ei ole vierasesineitä, infektoimiseen tarvitaan 10^5 bakteeria/kudosgramma, niin haavan, jossa on vierasesineitä, infektoimiseen riittää 10^4 bakteeria/kudosgramma. (Hendrickson 2012.) Jopa infektoitunut haava voi parantua itsestään, kun vierasesine on poistettu sieltä (Daeschlein 2013).

6.2.2 Antibioottien käyttö

Usein niin kauan kun bakteerit ovat planktonisessa muodossa, elimistön oma immuunipuolustus kykenee pitämään ne kurissa (Gardner ym. 2011). Joskus elimistön oma puolustusjärjestelmä tarvitsee kuitenkin apua akuutin infektion hoitoon. Tällöin

voidaan käyttää antibiootteja, jotka tuhoavat planktoniset bakteerit ja nujertavat infektion. Mikäli bakteeri-infektio kroonistuu, sinne on muodostunut biofilmiä. (Bjarnsholt 2013.) Biofilmi-infektioissa systeemisellä antibiootihoidolla ei saavuteta kovin hyviä tuloksia, sillä siitä on apua vain 25-30%:ssa tapauksista (Mancl ym. 2013). Antibiootihoidolla voidaan hetkellisesti helpottaa biofilmien aiheuttamien infektioiden oireita, mutta kuurin loputtua oireet palaavat (Costerton ym. 1999, Wolcott & Ehrlich 2008). Näin infektio voi jäädä persistoimaan jopa vuosiksi (Clutterbuck ym. 2007), sillä infektiopaikalle ei saada riittävän suurta antibiootikonsentraatiota (Kasimanickam ym. 2013). Tämä johtuu osittain siitä, että perinteisesti antibioottien annostus perustuu MIC-arvoon (minimum inhibitory concentration), joka on pienin bakteerien kasvun estävä lääkepitoisuus. Biofilmi-infektioissa pitäisi MIC-arvon sijaan käyttää MBEC-arvoa (minimum biofilm eradication concentration). (Westgate ym. 2011b.) MBEC-arvosta on kerrottu enemmän kappaleessa 5.2.3 Kuoppalevy.

Mikäli biofilmien hoitoon käytetään antibiootteja, niiden käyttö pitää olla päinvastaista kuin akuuttien infektioiden hoidossa, eli pitää käyttää useampaa valmistetta yhtä aikaa, normaalia suuremmalla annostuksella ja normaalia kauemmin. Tämä siksi, että biofilmit muodostuvat useista eri mikrobeista, kun taas akuuteissa infektioissa on yleensä vain yksi planktoninen taudinaiheuttaja. (Bjarnsholt 2013.) Esimerkiksi utaretulehdusten hoidossa on saatu parempia hoitovasteita antibiootikuurien kestoja pidentämällä (Melchior ym. 2005). Mikäli biofilmi-infektioita hoidetaan kuten akuutteja infektioita, voidaan jopa lisätä biofilmin bakteerien resistenssiä ja toleranssia. (Bjarnsholt 2013.)

6.2.3 Lääkehunaja

Hunajaa on käytetty lääkkeenä vuosituhansia (Mandal & Mandal 2011). Sitä on käytetty muun muassa haavojen (Majtan ym. 2014, Mandal & Mandal 2011, Merckoll ym. 2009), ylähengitystieinfektioiden (Alandejani ym. 2009) ja ripulin hoitoon (Lee ym. 2011, Mandal & Mandal 2011). Lääkehunajia on useita, joista tunnetuin on manuka-hunaja, jota saadaan Uudessa-Seelannissa kasvavasta *Leptospermum Scoparium* -pensaan medestä (Mandal & Mandal 2011).

Manuka-hunajan on todettu olevan tehokas *P. aeruginosa* -, *S. aureus* -, *Pr. mirabilis* -, *Ent. cloacae* - (Majtan ym. 2014) ja *E. coli* -bakteerien aiheuttamia biofilmejä vastaan *in vitro* (Lee ym. 2011). Lääkehunajat tehoavat jopa MRSA- ja MRSE-biofilmeihin (metisilliiniresistentti *Staphylococcus epidermidis*) sekä ESBL:a (Extended Spectrum

Beta Lactamase) tuottavaan *Klebsiella* biofilmiin (Merckoll ym. 2009). Kaiken kaikkiaan manuka-hunajan on todettu estävän noin 60 bakteerilajin kasvua, mutta jotkut tutkituista bakteereista ovat kasvaneet planktonisesti eivätkä biofilmissä (Mandal & Mandal 2011).

Eri hunajalaadut tehoavat erilailla eri bakteereihin (Majtan ym. 2014, Merckoll ym. 2009). Eri bakteerilajien ja jopa saman lajin eri kantojen herkkyys hunajalle vaihtelee. Jotkin bakteerit sietävät suurempaa hunajapitoisuutta kuin toiset. Planktonisten bakteerin kasvu estyy jo hyvin pienillä hunajapitoisuuksilla, mutta esimerkiksi *P. aeruginosa* biofilmin kasvun esto vaatii 25 %:n hunajapitoisuuden. (Merckoll ym. 2009.)

Hunaja ei ole antibiootti vaan monimutkainen sekoitus aineita ja ominaisuuksia, joilla on mikrobeja tappava vaikutus (Merckoll ym. 2009). Esimerkiksi manuka-hunaja sisältää useita muita hunajia enemmän metyylyglykoksalia (MGO), joka on tehokas bakteereita tappava aine. MGO pystyy tunkeutumaan biofilmin EPS:n sisään ja tappamaan biofilmin sisällä olevia bakteereita eli se on myös biofilmejä tuhoava aine. (Majtan ym. 2014.) Hunajalla on lisäksi osmoottinen vaikutus eli se imee itseensä kosteutta biofilmistä, koska hunajassa on paljon sokereita ja vähän vettä (Mandal & Mandal 2011, Vandamme ym. 2013). Muita hunajan bakteereita tuhoavia ominaisuuksia ovat niiden sisältämät sokerit ja/tai glykoproteiinit, jotka sitoutuvat bakteerin pinnalla oleviin reseptoreihin estäen bakteerien adheesion ja biofilmin muodostumisen. (Majtan ym. 2014.) Hunajan pH on tyypillisesti 3,2–4,5, mikä on riittävän matala estämään monen bakteerin kasvua (Mandal & Mandal 2011, Vandamme ym. 2013), sillä useimpien mikrobien optimi pH on 7,2–7,4 (Vandamme ym. 2013). Matjan ym. (2014) mukaan tehokkain biofilmejä tuhoava vaikutus on manuka-hunajalla.

Hunajan käytön hyötyjä on sen käytännöllisyys, edullisuus, myrkyttömyys ja hyvä siedettävyys (Majtan ym. 2014). Lisäksi se on varteenotettava ehdokas antibioottiresistenttien bakteereiden hoitoon, sillä mikrobiresistenssiä hunajaa kohtaan ei ole koskaan raportoitu (Mandal & Mandal 2011). Tuoreissa kliinisissä kokeissa on nähty haavojen paranevan nopeammin ja infektoituvan harvemmin hunajahoidolla kuin perinteisillä haavahoidoilla (Majtan ym. 2014).

6.2.4 Fysikaaliset menetelmät

Laserhoitoa kokeillaan biofilmien hillitsemiseksi (Daeschlein 2013). Sen ajatellaan nopeuttavan haavojen paranemista ja lisäävän kollageenin synteesiä sekä samalla

hillitsevän tulehdusreaktiota. Laserin on myös osoitettu hajottavan bakteerikasaumia. (Mancl ym. 2013).

Ultraäänellä voidaan vähentää biofilmejä (Kasimanickam ym. 2013). Sitä on kokeiltu muun muassa periodontiitin ja haavojen hoidossa (Mancl ym. 2013). Se esimerkiksi lisää bakteerien solukalvojen läpäisevyyttä, stimuloi antibioottien aktiivista tai passiivista sisäänottoa, ja sitä myöden aiheuttaa bakteereiden ja biofilmin solukalvojen reikiintymistä. Ultraäänellä on *in vitro* -tutkimuksissa havaittu olevan vaikutusta *S. epidermidis*-, *P. aeruginosa*- ja *E. coli* -biofilmeihin sekä *in vivo* -tutkimuksessa *E. coli* -biofilmiin. (Kasimanickam ym. 2013.)

Sähkövirralla voidaan lisätä antimikrobisten aineiden tehokkuutta biofilmejä vastaan. Esimerkiksi aminoglykosidien, kinolonien ja oksitetrazykliinien vaikutusta *P. aeruginosa*-, *K. pneumoniae*-, *S. epidermidis*-, *E. coli*- ja *Streptococcus gordonii* -bakteereja vastaan voidaan lisätä, jos antibioottien kanssa samaan aikaan käytetään samanaikaisesti matalaa sähkövirtaa (1,5–20 V/cm). Samalla antibioottien MIC-arvo voi pienentyä tuhannesosaan. (Kasimanickam ym. 2013.)

Negatiivisella painehoidolla (vakuumi) on saatu hyviä tuloksia monentyyppisten infektoituneiden ja kroonisten haavojen hoidossa (Daeschlein 2013). Hoidossa haavan päälle laitetaan eräänlainen vaahtomuovinpala. Vaahtomuovin päälle laitetaan dreniputki, jota pitkin mätä ja haavan muut eritteet pääsevät pois. Koko paketin päälle laitetaan läpinäkyvä teippi. (Webster ym. 2012.) Tämän menetelmän mahdollisia hyötyjä ovat lisääntynyt verenkierto, angiogeneesi (verisuonien uudismuodostus), granulaatiokudoksen muodostus sekä vähentynyt bakteerien määrä ja turvotus (Hendrickson 2012).

6.3 Tulevaisuuden lääkkeet

Uusilla lääkkeillä pyritään löytämään uusia toimintamalleja, joilla estetään biofilmien kehittyminen ja pystytään hoitamaan niiden aiheuttamat krooniset infektiot. Hoidoilla voidaan pyrkiä estämään bakteerien kiinnittyminen, estää EPS:n muodostuminen tai häiritä solujen välistä kommunikaatioita. Samalla voidaan käyttää bakteriostaattisia (bakteerien lisääntymistä estävä) tai bakteriosidisiä aineita. (Wolcott & Ehrlich 2008.)

6.3.1 Quorum sensing inhibiittorit

Quorum sensing inhibiittorit ovat mahdollisia tulevaisuuden lääkkeitä, joilla biofilmejä voitaisiin hoitaa (Clutterbuck ym. 2007). Sukkulamato- ja hirien keuhkotulehdusmalleilla tehdyissä kokeissa quorum sensing inhibiittorit ovat vaikuttaneet lupaavilta molekyyleiltä. Ne eivät pelkästään vähennä patogeenien virulenssia, vaan myös pehmentävät biofilmiä, jolloin antibiootit ja isännän immuunipuolustus pääsevät tuhoamaan bakteereita. Quorum sensing inhibiittorit eivät suoranaisesti tapa biofilmin soluja vaan toimivat yhteistyössä antibioottien ja immuunipuolustuksen kanssa. Quorum sensing:a inhiboivia aineita on useita esimerkiksi furanonit, asyyli-homoseriini-laktoni-laktonaasi ja triklosaani. (Bhardwaj ym. 2013.)

Myös valkosipulin (*Allium sativum*) on havaittu vähentävän quorum sensing:a *P. aeruginosa* -biofilmeissä, ja sitä myöden virulenssitekijöiden, kuten elastaasin rhamnolipidin, sideroforien, eksotoksiini A:n, eksoentsyymi S:n, proteaasien, alginaatin ja hemolysiinin, muodostumista sekä *in vitro*- että hiirikokeissa (Bjarnsholt ym. 2005, Harjai ym. 2010). Tarkkaa mekanismia, jolla valkosipuli inhiboi quorum sensing:a, ei tiedetä (Bjarnsholt ym. 2005).

Harjai kumppaneineen (2010) tutki valkosipulin vaikutusta *in vitro* ja virtsatieinfektio-hiirimallilla. *In vitro* -tutkimuksessa he kasvattivat *P. aeruginosa* -biofilmejä virtsakatetreissa valkosipuliuutetta sisältävissä sekä sisältämättömissä kasvuliuksissa. Biofilmiä muodostui huomattavasti vähemmän katetreissa, jotka olivat olleet valkosipuliuutteessa. Lisäksi he havaitsivat, että hiirillä, joille oli annettu profylaktisesti valkosipuliuutetta, oli vain lieviä tulehdusmuutoksia munuaisissaan. Sen sijaan kontrolliryhmällä, joka ei saanut valkosipuliuutetta, oli vakavia tulehdusmuutoksia munuaisissaan.

Bjarnsholt kollegoineen (2005) tutkivat valkosipuliuutteen vaikutusta liuskatumaisiin valkosoluihin (granulosyytteihin) keuhkotulehduksessa hiirillä. He havaitsivat, että hiiret, jotka olivat saaneet valkosipuliuutetta, kehittivät voimakkaamman tulehdusvasteen kuin kontrolliryhmä. Valkosipuliuutetta saaneilla hiirillä oli enemmän liuskatumaisia valkosoluja ja monosyyttejä keuhkoissaan kuin kontrolliryhmällä. Vaikuttaa siltä, että kun quorum sensing -järjestelmä on estetty, liuskatumaiset valkosolut ovat aktiivisia ja pystyvät tehokkaasti hävittämään bakteerit. Lisäksi

valkosipulilla on antimikrobisia, antioksidanttisia, syöpää ehkäiseviä ja sieni-infektioita ehkäiseviä vaikutuksia (Bjarnsholt ym. 2005.)

Valkosipuliuutteen vaikutusta on tutkittu jo ihmiskokeessa, jossa valkosipuliuutetta annettiin kystistä fibroosia sairastaville potilaille. Siinä saadut tulokset olivat lupaavia. (Bhardwaj ym. 2013.)

6.3.2 Kuusenpihka

Useissa tutkimuksissa on metsäkuusen (*Picea abies*) pihkalla on todettu olevan antibakteerisia vaikutuksia (Rautio ym. 2007, Sipponen ym. 2008, Sipponen ym. 2012). *In vitro* -kokeissa sen on havaittu olevan tehokas gram-positiivisia bakteereita sekä gram-negatiivista *Pr. vulgaris* -bakteeria vastaan. Lisäksi se tehoaa metisilliiniresistenttiä *Staphylococcus aureus* -bakteeria (MRSA) ja vankomysiini resistenttiä enterokokkia (VRE) vastaan (Rautio ym. 2007). Myös jotkut dermatofyytit (siltsasienet) kuten *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* ja *Trichophyton mentagrophytes* ovat myös herkkiä pihkalle (Sipponen ym. 2012). Ihmisillä tehdyissä kliinisissä kokeissa pihkapohjaisen voiteen on havaittu nopeuttavan vakavien, kroonisten ja komplisoitujen paine- ja leikkaushaavojen paranemista (Sipponen ym. 2008, Sipponen ym. 2012).

Aivan yksityiskohtaisesti ei tiedetä, mihin kuusenpihkan antibakteeriset ja haavojen paranemista nopeuttava vaikutus perustuu. Tutkimuksissa on havaittu pihkan tuhoavan bakteerien solukalvoja ja -seiniä. Haavojen paranemisen nopeutuminen perustuu lignaaneihin. Lignaaneilla on muun muassa antioksidatiivisia vaikutuksia, joiden uskotaan nopeuttavan haavojen paranemista. Lisäksi pihkan oletetaan kykenevän hajottamaan biofilmejä. (Sipponen ym. 2012.)

Kuusenpihkavoide on myös edullista (Sipponen ym. 2012). Sipponen kumppaneineen (2012) laskivat, että voide tulisi maksamaan vain noin viidesosan siitä mitä esimerkiksi lääkehunaja maksaa. Haittapuolena on se, että pihka voi allergisoida. Ihmisistä 1-3 % on allergisia pihkalle. Tutkijat ovat kuitenkin sitä mieltä, että riski saada allerginen reaktio pihkavoiteesta on pieni.

Tutkimuksessa mukana olleiden koehenkilöiden määrät ovat olleet pieniä. Sipponen ja kumppaneiden tutkimuksessa vuonna 2008 oli mukana 22 henkilöä ja Sipposen ja kollegoiden vuoden 2012 kliinisessä tutkimuksessa oli mukana 23 koehenkilöä.

Tarvitaan siis vielä lisää tutkimuksia ennen kuin tuloksia voidaan yleistää, mutta tämän hetkiset tulokset näyttävät lupaavilta (Sipponen 2012).

6.3.3 Effluksipumppuinhibiittorit

Effluksipumppuinhibiittorit (Efflux Pump Inhibitors, EPIs) ovat lupaavia tulevaisuuden lääkkeitä, sillä niiden avulla voidaan mahdollisesti palauttaa nykyisten antibioottien teho (Pagès ym. 2005). EPIs-antibiootti yhdistelmän toivotaan lisäävän antibioottien solunsisäistä konsentraatiota, vähentävän bakteerien luontaista resistenssiä antibiootteja vastaan ja vähentävän resistenttien mutaatiokantojen esiintyvyyttä (Zechini & Versace 2009). Osa EPIs:ta kykenee myös estämään biofilmien muodostusta (Soto 2013).

EPIs effluksipumppujen toiminnan esto perustuu muun muassa seuraaviin kykyihin: romahduttaa pumpun energiansaanti, sitoutua pumppuihin joko kilpailevasti tai kilpailemattomasti ja näin estää substraatin pääsyn pumppuun, tukkia ulkokalvon kanava tulpalla tai muuttaa pumpun substraatin aktiivisuutta. Tällaisia yhdisteitä ovat esimerkiksi fenyylialaniini-arginiini- β -naftyyliamiini (PA β N), tiordatsiini ja naftyyli-metyyli-piperatsiini. Näiden yhdisteiden on havaittu vähentävän biofilmin muodostusta useilla bakteereilla kuten *E. coli*-, *K. pneumoniae*- ja *S. aureus* -bakteereilla. (Soto 2013.) Lisäksi esimerkiksi PA β N on todettu palauttavan useiden antibioottien, kuten levofloksasiinin, kloramfenikolin, makrolidien ja rifampisiinin, tehon (Zechini & Versace 2009). Ennen kuin EPIs:n teho biofilmien ehkäisyssä voidaan yleistää, tarvitaan vielä lisää tutkimuksia, mutta tämän hetkiset tulokset osoittavat, että EPIs kehitystä biofilmien vastaiseksi lääkkeeksi kannattaa jatkaa (Soto 2013).

7 POHDINTA

7.1 Tavoitteiden arviointi

Kirjallisuuskatsauksen ensimmäisenä tavoitteena oli kerätä yhteen eläinlääketieteellisesti tärkeimpiä biofilmien aiheuttamia bakteeri-infektioita. Joidenkin keskeisten infektioiden kohdalla tämä osoittautui hieman haastavaksi. Vaikka biofilmit ovat keskeinen ongelma vierasesineinfektiossa, eläinlääketieteessä tästä aiheesta ei löydy kovinkaan montaa tutkimusta. Esimerkiksi erilaisista katetri-infektioista löytyy tutkimuksia, mutta vain yhdessä tutkimuksessa (Segev ym. 2013) oli tutkittu biofilmien yhteyttä infekioon. Kuitenkin muissa tutkimuksissa katetri-infektioissa löydetty taudinaiheuttajat kuten *P. aeruginosa*, *E. coli* ja stafylokokki-lajit voivat olla biofilmien

muodostajia. Tämän perusteella voidaan olettaa, että biofilmit ovat osallisina eläinten katetri-infektioissa. Tulevaisuudessa tulee toivottavasti lisää eläinlääketieteellisiä tutkimuksia biofilmien ja katetri-infektioiden yhteydestä.

Haavainfektioista tehdyt tutkimukset keskittyivät hevosten kroonisiin infektioihin. Yllättävää sen sijaan oli, että ensimmäinen tutkimus (Freeman ym. 2009), jossa biofilmien osallisuus haavainfektioihin osoitettiin, oli vasta vuodelta 2009. Toinen yllättävä asia oli, että tutkimuksia biofilmien osallisuudesta haavainfektioihin löytyi vain hevosilta. Voidaan kuitenkin otaksua, että ne ovat ongelma myös muiden eläinlajien haavainfektioissa.

Biofilmien osallisuudesta utaretulehdukseen löytyi runsaasti tietoa. Viime vuosina on alettu tutkia erityisesti erilaisia keinoja, joilla voidaan erottaa toisistaan biofilmejä tuottavat ja tuottamattomat utaretulehduksen aiheuttajat toisistaan. Tämä on tärkeää, sillä niiden hoitostrategiat ovat erilaiset. Utaretulehdusta hoidetaan yleensä vedinkanavaan laitettavalla antibiootilla (Pyörälä & Tiihonen 2005), mutta jos tulehduksen on aiheuttanut biofilmejä muodostava kanta, ei normaalilla annoksella ja normaalilla kuurinkestolla saavuteta hyvä hoitotulosta, vaan tarvitaan suuremmat annokset ja pidemmät kuurit (Melchior ym. 2005). Tätä ei voida kuitenkaan tehdä loputtomiin, sillä ennemmin tai myöhemmin ollaan tilanteessa, ettei annoksia voida enää nostaa. Jos siinä vaiheessa ei ole löydetty muita hoitokäytäntöjä ja -keinoja biofilmien aiheuttamisen utaretulehdusten hoitamiseksi, nousevat utaretulehduksen aiheuttamat kustannukset sietämättömän korkeiksi. Tämän perusteella on ymmärrettävää, että utaretulehduksen tutkimukseen on panostettu paljon.

Biofilmit ovat ongelma myös muissa sairauksissa. Osteomyeliitti on tunnetusti hankalasti parannettava sairaus ja biofilmien tiedetään liittyvän sen patogeneesiin. Sen vuoksi oli hieman yllättävää, ettei löytynyt eläinlääketieteellisiä tutkimuksia, joissa olisi tutkittu suoranaisesti biofilmien ja osteomyeliitin välistä yhteyttä.

Lisäksi työssä esiteltiin sekalainen joukko muita infektiota, joihin liittyy biofilmien muodostus. Silti tässä työssä esitellyt biofilmejä tuottavat bakteerit ja niihin liitetyt sairaudet ovat vain pieniosa kaikista bakteeri-infektiosta, joihin biofilmit liittyvät. Todennäköistä on, ettei vielä edes tunneta kaikkia sairauksia ja bakteereita, joihin biofilmit liittyvät. Kirjoittaja kuitenkin toivoo, että on pystynyt työssä esitettyjen esimerkkien avulla korostamaan biofilmien tärkeyttä bakteeri-infektioissa.

Työn tavoitteena oli myös kertoa erilaisista diagnostisista menetelmistä. Biofilmien tunnistamiseen on olemassa erilaisia sovelluksia. Niissä kaikissa on omat vahvuutensa ja heikkoutensa. Valomikroskoopilla ja erilaisilla värjäysmenetelmillä pystytään usein nopeasti havaitsemaan biofilmin läsnäolo, muttei tarkasti sitä mitä mikrobilajeja biofilmi sisältää. Tieto biofilmin sisältämisestä mikrobilajeista olisi tärkeä potilaan hoidon kannalta, jotta osattaisiin valita sopivat lääkkeet ja hoitokeinot infektion hoitoon. Monenlaisia viljelymenetelmiä on kehitetty biofilmien tutkimiseen, mutta niissäkin on rajoituksia. Yksi iso ongelma on se, että viljelyä varten biofilmit pitäisi saada irti alkuperäisestä kasvupaikastaan. Usein biofilmit kärsivät toimenpiteessä vaurioita, minkä vuoksi viljelymenetelmät eivät ole riittävän luotettavia ainakaan ainoaksi diagnostiseksi menetelmäksi. DNA-pohjaiset menetelmät tulevat olemaan tulevaisuudessa hyvin tärkeitä. Niissäkin on omat rajoitteensa, sillä PCR:ta hyödynnettäessä pitää olla jo melko paljon etukäteistietoa, jotta niiden avulla voidaan tutkia biofilmejä. Suurena haasteena on löytää sopivat alukkeet, jotta tutkittava asia löytyisi. Aiheen tutkimus on kuitenkin kiivasta ja uutta tutkimustietoa tulee koko ajan. On luultavasti vain ajan kysymys, milloin DNA-pohjaisista menetelmistä tulee biofilmitutkimuksen ja -diagnostiikan kulmakivi. Laitteistovaatimusten vuoksi ne eivät todennäköisesti tule kuulumaan jokaisen laboratorion tutkimusvalikoimaan ja perusvälineistöön.

Tulevaisuudessa on tärkeää keskittyä kliiniseen käyttöön soveltuvien diagnostisten menetelmien kehittämiseen, sillä infektiota ei voida hoitaa menestyksellisesti, ellei tiedetä, mikä vihollinen on. Nopeiden, helppojen, edullisten ja ei-invasiivisten *in vivo* -osoitusmenetelmien puute voi johtaa potilaan hoidon ohjautumiseen väärille urille tai ainakin viivästyttää oikeaan diagnoosiin pääsyä. Tästä on pahimmillaan seurauksena potilaan kuolema. Vaikka potilaan kuolemalta vältyttäisiin, biofilmi-infektio lisää usein sairastuvuutta sekä hoitopäiviä ja -kustannuksia.

Lisäksi työn tavoitteena oli kertoa erilaisista hoitomenetelmistä. Kroonisten infektioiden hoito on haastavaa ja pelkkä antibioottihoito on usein riittämätön keino niiden hoitoon. Tähän on havahduttu ja esimerkiksi kroonisten haavainfektioiden hoidossa käytetään uusia (kuten haavan negatiivinen painehoito) ja vanhoja uudelleen löydettyjä keinoja (kuten lääkehunaja). Vierasesineinfektioiden hoitoon ja ehkäisyyn on kiinnitetty paljon huomiota. Tämä on ymmärrettävää, sillä nämä ovat aivan liian yleisiä ja turhia

infektioita. Mikäli näiden infektioiden määrää saataisiin vähennettyä, voitaisiin terveydenhuollon resursseja suunnata muiden sairauksien hoitoon.

7.2 Tulevaisuuden haasteet

Tulevaisuudessa pitää tehdä lisää *in vivo* -tutkimuksia, joilla voidaan tutkia lähemmin muun muassa keinoja, joilla biofilmit häiritsevät isännän immuunipuolustusta. Tämä on vielä melko huonosti tunnettu alue. Mikäli aihetta ymmärrettäisiin paremmin, voitaisiin löytää keinoja tai lääkeaineita, jolla elimistön omaa immuunipuolustusta voidaan tukea. Myös quorum sensing on aihe, jota ei vielä ymmärretä kovin hyvin. Lisätutkimuksissa voisivat löytyä uusia mekanismeja ja yhdisteitä, joita voidaan hyödyntää lääketieteessä. Quorum sensing inhibiittoreiden tutkimukset ovat jo melko pitkällä ja toivottavasti ne saadaan pian markkinoille. Uusien lääkkeiden löytäminen on hyvin tärkeää, sillä pelkillä antibiooteilla biofilmejä ei saada kuriin.

Oleellista on myös, että kliinistä työtä tekevät eläinlääkärit ottavat huomioon biofilmit. Ottaen huomioon sen, että biofilmien arvioidaan olevan osallisena noin 80 %:ssa ihmisten mikrobiologisissa infektioissa (Bordi & de Bentzmann 2011), biofilmien voidaan olettaa olevan huomattavassa roolissa myös eläinten mikrobiologisissa infektioissa. Erityisesti kroonisten infektioiden hoidossa on tärkeää, ettei eläimille ainoastaan määrätä antibiootteja ja toivota niiden auttavan. Muitakin hoitokeinoja on mietittävä. Tämä on mahdollista esimerkiksi kroonisten haava- ja katetri-infektioiden yhteydessä, joiden hoitoon on myös vaihtoehtoisia ja antibioottihoitoa tukevia menetelmiä. Joidenkin infektioiden, kuten pneumonioiden, hoidossa muiden kuin antibiootihoidon käyttö on haastavaa. Tällöin pitää muistaa, että antibiootin käytön tulee olla sellaista, että saavutetaan riittävän suuri konsentraatio kohdekudokseen. Sen vuoksi on tärkeää, että saataisiin kehitettyä muita lääkkeitä, joiden avulla voitaisiin tehostaa antibioottien vaikutusta.

Tämä kirjallisuuskatsaus jäi monilta osin melko pintapuoliseksi tarkasteluksi, koska biofilmit bakteeri-infektioissa on hyvin laaja aihe. Esimerkiksi eläinlääketieteellisesti merkittävä aihe, biofilmit utaretulehduksessa, jäi melko vähälle huomiolle. Biofilmeistä ja utaretulehduksesta riittäisi materiaalia vaikka omaan kirjallisuuskatsaukseen. Lisäksi biofilmien hoitoon mahdollisesti tulevaisuudessa käytettävistä aineista löytyy paljon lisää mielenkiintoisia tutkimuksia, joita ei käyty läpi tässä kirjallisuuskatsauksessa.

Kaikista käsitellyistä aiheista löytyy paljon lisää mielenkiintoista tietoa. Tutkitun tiedon määrää biofilmeistä lisääntyy huimaa vauhtia. Tämän kirjoitusprosessin aikanakin julkaistiin monia uusia tutkimuksia aiheesta, joita ei saatu mahdutettu tähän kirjallisuuskatsaukseen. Tämä aiheuttaa harhaa katsaukseen.

Biofilmejä on tutkittu lääketieteessä valtavasti ja niistä tiedetään paljon, muttei tarpeeksi. Biofilmitutkimukseen kannattaa uhrata aikaa ja rahaa, sillä se tulee maksamaan itsensä takaisin henkien pelastumisena, inhimillisen kärsimyksen vähenemisenä ja taloudellisina säästöinä.

KIRJALLISUUSLUETTELO

Ahern B.J, Richardson D.W, Boston R.C, Schaer T.P. Orthopedic Infections in Equine Long Bone Fractures and Arthrodeses Treated by Internal Fixation: 192 Cases (1990–2006). *Veterinary Surgery*. 2010. 39: 588-593.

Alandejani T, Marsan J, Ferris W, Slinger R. Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*. 2009. 141: 114-118.

Aslam. S. Effect of antibacterials on biofilms. *American Journal of Infection Control*. 2008. 36: S175.e9-S175.e11.

Bhardwaj A.K, Vinothkumar K, Rajpara N. Bacterial Quorum Sensing Inhibitors: Attractive Alternatives for Control of Infectious Pathogens Showing Multiple Drug Resistance. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. 2013. 8: 68-83.

Bischofberger A.S, Dart C.M, Perkins N.R, Kelly A, Jeffcott L, Dart A.J .The Effect of Short- and Long-Term Treatment with Manuka Honey on Second Intention Healing of Contaminated and Noncontaminated Wounds on the Distal Aspect of the Forelimbs in Horses. *Veterinary Surgery*. 2013. 42: 154–160.

Bjarnsholt T, Jensen P. Ø, Rasmussen T.B, Christophersen L, Calum H, Hentzer M, Hougen H-P, Rygaard J, Moser C, Eberl L, Høiby N, Givskov M. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology*. 2005. 151: 3873-3880.

Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS*. 2013. 121:1-51.

Böhnel H, Gessler F. Neurotoxigenic Clostridia. Teoksesta Gyles C.L, Prescott J.F, Songer J.G, Thoen C.O (toim.). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Blackwell Publishing. 4. painos. 2010: 189-202.

Bordi C, de Bentzmann S. Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. *Annals of Intensive Care*. 2011. 1:19

- Brady R.A, Leid J.G, Calhoun J.H, Costerto J.W, Shirtliff M.E. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2008. 52: 13–22.
- Bubenik LJ, Hosgood GL, Waldron DR, Snow LA. Frequency of urinary tract infection in catheterized dogs and comparison of bacterial culture and susceptibility testing results for catheterized and noncatheterized dogs with urinary tract infections. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2007. 231: 893–899.
- Caiazza N.C, O'Toole G.A. SadB Is Required for the Transition from Reversible to Irreversible Attachment during Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology*. 2004. Vol. 186: 4476-4485.
- Ceri H, Olson M, Morck D, Storey D, Read R, Buret A, Olson B. The MBEC Assay System: Multiple Equivalent Biofilms for Antibiotic and Biocide Susceptibility Testing. *Methods in Enzymology*. 2001. 377-385.
- Ceri H, Olson M.E, Stremick C, Read R.R, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of clinical microbiology*. 1999. 37:1771-1776.
- Christensen G.D, Simpson W.A, Bisno A.L, Beachey E.D Adherence of Slime-Producing Strains of *Staphylococcus epidermidis* to Smooth Surfaces. *Infection and immunity*. 1982. 37:318-326.
- Christensen G.D, Simpson W.A, Younger J.J, Baddour L.M, Barrett F.F, Melton D.M, Beachey E.D. Adherence of coagulase negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology* 1985. 22:996–1006.
- Clegg P.D. Osteomyelitis in the Veterinary Species. Teoksesta Percival S.L, Derek C. Knottenbelt D.C, Cochrane C.A (toim.). *Biofilms and veterinary medicine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011b:147-166.
- Clutterbuck A., Woods E.J, Knottenbelt D.C, Clegg P.D, Cochrane C.A, Percival S.L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. 2007. 121: 1-17.

- Conibear T.C.R, Collins S.L, Webb J.S. Role of Mutation in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. Public Library of Science ONE. 2009. 4:e6289.
- Costerton J.W, Philip S, Stewart P.S, Greenberg E.P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. 1999. SCIENCE Vol. 284:1318-1322.
- Daeschlein G. Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management. International Wound Journal. 2013. 10: 9-14.
- de Castro Melo P, Ferreira L.M, Filho A.N, Zafalon L.F, Vicente H.I.G, de Souza V. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. Brazilian Journal of Microbiology. 2013. 44: 119-124.
- Dentle C, Looke D. Management of mammalian bites. Australian family physician. 2009. 11: 868-874.
- Donati C, Hiller N. L, Tettelin H, Muzzi A, Croucher N.J, Angiuoli S.V, Oggioni M, Dunning Hotopp J.C, Hu F.Z, Riley D.R, Covacci A, Mitchell T.J, Bentley S.D, Kilian M, Ehrlich G.D, Rappuoli R, Moxon E.R, Masignani V. Structure and dynamics of the pan-genome of *Streptococcus pneumoniae* and closely related species. Genome Biology. 2010. 11: R107-R126.
- Donlan R.M, Costerton J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clinical Microbiology. Reviews. 2002, 15(2):167.
- Donlan R.M. Biofilms and Device-Associated Infections. Emerging Infectious Diseases 2001: Mar-Apr; 7(2): 277-281.
- Endimiani A, Hujer K.M, Hujer A.M, Bertschy I, Rossano A, Koch C, Vinzenz Gerber V, Thierry Francey T, Bonomo R.A, Perreten V. *Acinetobacter baumannii* isolates from pets and horses in Switzerland: molecular characterization and clinical data. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2011. 66: 2248-2254
- Figueredo L.A, Cafarchia C, Otranto D. Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatous* biofilm. Medical Mycology. 2013. 51: 863–867.
- Freeman D.J, Falkiner F.R, Keane C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. Journal of clinical pathology. 1989. 42:872-874.

- Freeman K, Woods E, Welsby S, Percival S.L, Cochrane C.A. Biofilm evidence and the microbial diversity of horse wounds. *Microbiology*. 2009. 55:197-202.
- Gardner A.J, Percival S.L, Cochrane C.A. Biofilms and role to Infection and Disease in Veterinary Medicine. Teoksesta Percival S.L, Derek C. Knottenbelt D.C, Cochrane C.A (toim.). Biofilms and veterinary medicine. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011:118-119.
- Geraghty T.E, Love S, Taylor D.J, Heller J, Mellor D.J, Hughes K.J. Assessment of subclinical venous catheter-related diseases in horses and associated risk factors. *Veterinary Record*. 2009 164: 227-231.
- Gomez-Alvarez V, Randy P Revetta R.P, Santo Domingo J.W. Metagenome analyses of corroded concrete wastewater pipe biofilms reveal a complex microbial system. *BMC Microbiology*. 2012. 12: 122.
- González J.E, Keshavan N.D. Messing with Bacterial Quorum Sensing. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2006. Vol. 70. 4: 859-875.
- Goodrich L.R, Osteomyelitis in Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2006. 22:389-417.
- Gorrel C. Home Care: Products and Techniques. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 2000. 15: 226-231.
- Harjai K, Kumar R, Singh S. Garlic blocks quorum sensing and attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2010 58: 161-168.
- Harris J.F, Sofiya Micheva-Viteva, Li N, Hong-Geller E. Small RNA-mediated regulation of host–pathogen interactions. *Landes Bioscience*. 2013. *Virulence* 4:8, 1-11.
- Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011. 15(4): 305-311.
- Hendrickson, D.A. Management of superficial wounds. Teoksesta Auer J.A, Stick J.A (toim.). *Equine Surgery*. Elsevier Saunders. 4. painos. 2012: 306-317.

- Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010. 35: 322-332.
- Hooper S. J, Percival, S. L, Cochrane C. A, Williams D. W. Biofilms and Implication in Medical devices in Human and Animals. Teoksesta Percival S.L, Derek C. Knottenbelt D.C, Cochrane C.A (toim.). *Biofilms and veterinary medicine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011: 195.
- Hooper S.J, Percival S.L, Cochrane C.A, Williams D.W. Biofilms and Implication in Medical Devices in Humans and Animals. Teoksesta Percival S.L, Derek C. Knottenbelt D.C, Cochrane C.A (toim.). *Biofilms and veterinary medicine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011: 192-200.
- Hugonnard M, Chalvet-Monfray K, Dernis J, Pouzot-Nevoret C, Barthélémy A, Vialard J, Goy-Thollot I. Occurrence of bacteriuria in 18 catheterized cats with obstructive lower urinary tract disease: a pilot study. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2013. 15(10) 843-848.
- Johansen L.K, Koch J, Frees D, Aalbæk, Nielsen O.L, Leifsson P.S, Iburg T.M, Svalastoga E, Buenlund L.E, Bjarnsholt T, Høiby N, Jensen H.E. Pathology and Biofilm Formation in a Porcine Model of Staphylococcal Osteomyelitis. *Journal of Comparative Pathology*. 2012. 147: 343-353.
- Kasimanickam R.K, Ranjan A, Asokan G.V, Kasimanickam V.R, Kastelic J.P. Prevention and treatment of biofilms by hybrid- and nanotechnologies. *International Journal of Nanomedicine*. 2013. 8: 2809-2819.
- Kovacs B, Le Gall-David S, Vincent P, Le Bars H, Buffet-Bataillon S, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A. Is biofilm formation related to the hypermutator phenotype in clinical *Enterobacteriaceae* isolates?. *FEMS Microbiology*. 2013. 347:116-122.
- Lappin-Scott H.M, Bass C. Biofilm formation: Attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces. *American Journal of Infection Control*. 2001. 29:250-251.
- LeBlanc M.M. Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post-Mating-Induced Endometritis in the Mare. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010.45: 21-27.

- Lee J-H, Park J-H, Kim J-A, Neupane G.P, Cho M.H, Lee C-S, Lee J. Low concentrations of honey reduce biofilm formation, quorum sensing, and virulence in *Escherichia coli* O157:H7. *Biofouling*. 2011. 10:1095-1104.
- Lynch S, Robertson G. Bacterial and Fungal Biofilm Infections. *The Annual Review of Medicine*. 2008. 59: 415-28.
- MacInnes J.I. Actinobacillus. Teoksesta Gyles C.L, Prescott J.F, Songer J.G, Thoen C.O (toim.). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Blackwell Publishing. 4. Paines. 2010: 363-386.
- Majtan J, Jana Bohova J, Horniackova M, Klaudiny J, Majtan V. Pathogens *Proteus mirabilis* and *Enterobacter cloacae*. *Phytotherapy Research*. 2014. 28: 69-75.
- Mancl K.A, Kirsner R.S, Ajdic D. Wound biofilms: Lessons learned from oral biofilms. *Wound Healing Society*. 2013. 21:352-362.
- Mandal M.D, Mandal S. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal on Tropical Biomedicine*. 2011. 154-160.
- Marsh-Ng M.L, Burney D.P, Garcia J. Surveillance of Infections Associated With Intravenous Catheters in Dogs and Cats in an Intensive Care Unit. *JOURNAL of the American Animal Hospital Association*. 2007. Vol. 43 13-20.
- Melchior M.B, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? *The Veterinary Journal*. 2006. 171: 398-407.
- Merckoll P, Jonassen T. Ø, Vad M.E, Jeansson S.L, Melby K.K. Bacteria, biofilm and honey: A study of the effects of honey on 'planktonic' and biofilm-embedded chronic wound bacteria. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2009. 41: 341-347.
- Merlichior M.B. Bovine Mastitis and Biofilms. Teoksesta Percival S.L, Derek C. Knottenbelt D.C, Cochrane C.A (toim.). *Biofilms and veterinary medicine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011: 205-217.
- Moreira C.A, de Oliveira L.C, Mendes M.S, de Melo Santiago T, Barros E.B, de Carvalho C.B.M. Biofilm production by clinical staphylococci strains from canine otitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012. 43: 371-374.

NetMot sanakirja. 2013.

https://alma.helsinki.fi/window/43166?callURL=http%253A%252F%252Fmot.kielikon.e.fi%252Fmot%252Fhelyo%252Fnetmot.exe&pX_UI=file&pX_Opt=8&pX_dic=22&pX_SearchWord=beetalaktamaasi&pX_Search=+Etsi+. Haettu 27.11.2013.

NetMot sanakirja. 2014a.

https://alma.helsinki.fi/window/43166?callURL=http%253A%252F%252Fmot.kielikon.e.fi%252Fmot%252Fhelyo%252Fnetmot.exe&pX_UI=file&pX_Opt=8&pX_dic=22&pX_SearchWord=pleuropneumonia&pX_Search=+Etsi+. Haettu 3.1.2014.

NetMot sanakirja. 2014b.

<https://alma.helsinki.fi/window/43166?callURL=http%3A%2F%2Fmot.kielikone.fi%2Fmot%2Fhelyo%2Fnetmot.exe%3Fdic%3D22%26SearchWord%3Dprofylaksi%26UI%3Dfile%26Opt%3D1>. Haettu 20.2.2014.

Niemiec B.A. Periodontal Disease. Companion Animal Medicine. 2008. 23: 72–80.

O’Grady N.P, Alexander M, Burns L.A, Dellinger E.P, Garland J, Heard J.G, Lipsett P.A, Masur H, Mermel L.A, Pearson M.L, Raad I.I, Randolph A.G, Rupp M.E. Saint S, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Guidelines for Prevention of Intravascular Catheter-related Infections. Clinical Infectious Diseases. 2011. 52:e162-e193.

O’Toole G.A, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS366 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. Molecular Microbiology. 1998. 28: 449-461.

Oliveira M, Bexiga R, Nunes S.F, Carneiro C, Cavaco L.M, Bernardo F, Vilela C.L. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. Veterinary Microbiology. 2006. 118: 133-140.

Pagès J-M, Masi M, Barbe J. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. TRENDS in Molecular Medicine. 2005. 11:382-389.

Percival S.L, Walker J, Hunter P. Introduction to Biofilm. Teoksesta Percival S.L, Derek C. Knottenbelt D.C, Cochrane C.A (toim.). Biofilms and veterinary medicine. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011: 41, 42, 46, 51.

- Pye C.C, Yu A.A, Weese J.S. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility in vitro. *Veterinary Dermatology*. 2013. 24: 446–e99.
- Pyörälä S, Tiihonen T. Utaretulehdus eli mastiitti. Teoksesta Pyörälä S, Tiihonen T. Oppimateriaalia 6. Nautojen sairaudet. Helsingin yliopisto. Eläinlääketieteellinen tiedekunta. 2005.
- Quinn P.J, Markey B.K, Leonard F.C, FitzPatrick E.S, Flanning S, Hartigan P.J. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2. painos. Wiley-Blackwell, UK. 2011.
- Raad I. Intravascular-catheter-related infections. *The Lancet*. 1998. 351: 893-98.
- Ramage G, Martinez P.J, Lopez-Ribot J.L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast*. 2006. Res 6: 979-986.
- Rautio M, Sipponen A, Peltola R, Lohi J, Jokinen J, Papp A, Carlson P, Sipponen P. Antibacterial effects of home-made salve from Norway spruce (*Picea abies*). *APMIS*. 2007. 115:335-340.
- Rumi M.V, Huguet M.J, Bentancor A.B, Gentilini E.R. The *icaA* gene in staphylococci from bovine mastitis. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2013. 7:556-560.
- Sandal I, Corbeil L.B, Inzana T.J. *Haemophilus*. Teoksesta Gyles C.L, Prescott J.F, Songer J.G, Thoen C.O (toim.). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Blackwell Publishing. 4. Painos. 2010: 387-409.
- Seveg G, Bankire T, Steinberg D, Duvdevani M, Shapur N.K, Friedman M, Lavy E. Evaluation of Urinary Catheters Coated with Sustained-Release Varnish of Chlorhexidine in Mitigating Biofilm Formation on Urinary Catheters in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2013. 27:39-46.
- Shaw G.L, Choong S.K, Fry C. Encrustation of biomaterials in the urinary tract. *Urological Research*. 2005. 33: 17-22.
- Shunmugaperumal T. Analytical techniques useful to study biofilms. Teoksesta Shunmugaperumal T. *Biofilm Eradication and Prevention: A Pharmaceutical Approach to Medical Device Infections*. John Wiley & Sons, Inc. 2010b:120-140.

Shunmugaperumal T. Biofilm resistance – tolerance to conventional antimicrobial agents. Teoksesta Shunmugaperumal T. Biofilm Eradication and Prevention: A Pharmaceutical Approach to Medical Device Infections. John Wiley & Sons, Inc. 2010a: 88.

Simojoki H, Hyvönen P, Ferrer C.P, Taponen S, Pyörälä S. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? Veterinary Microbiology. 2012. 158:344-352.

Sipponen A, Jokinen J.J, Sipponen P, Papp A, Sarna S, Lohi J. Beneficial effect of resin salve in treatment of severe pressure ulcers: a prospective, randomized and controlled multicenter trial. British Journal of Dermatology. 2008. 158: 1055-1062.

Sipponen A, Kuokkanen O, Tiihonen R, Kauppinen H, Jokinen J. Natural coniferous resin salve used to treat complicated surgical wounds: pilot clinical trial on healing and costs. The International Society of Dermatology. 2012. 51: 726-732.

Soto S.M. Role of effluksi pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. Virulence. 2013. 3: 223-229.

Stoodley P, Sauer K, Davies D.G, Costerton W. Biofilms as complex differentiated communities. Microbiology. 2002. 56: 187–209.

Taponen S, Pyörälä S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis - Not so different from *Staphylococcus aureus*?. Veterinary medicine. 2009. 134:29-34.

Thien-Fah M. Biofilm-specific antibiotic resistance. Future Microbiology. 2012. 7:1061-1072.

Tran P.A, Webster T.J Antimicrobial selenium nanoparticle coatings on polymeric medical devices. Nanotechnology. 2013. 155101.

Trautner B.W, Darouiche R.O. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. American Journal of Infection Control. 2004. 32(3): 177-183.

Vandamme L, Heyneman A, Hoeksema H, Verbelen J, Monstrey S. Honey in modern wound care: A systematic review. Burns. 2013. Vol 39. 8: 1514–1525.

- Vanechoutte M, Devriese L.A, Dijkshoorn L, Lamote B, Deprez P, Verschraegen G, Haesebrouck F. *Acinetobacter baumannii*-Infected Vascular Catheters Collected from Horses in an Equine Clinic. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000. 11: 4280-4281.
- Wang Y, Zhang W, Wu Z, Lu C. Reduced virulence is an important characteristic of biofilm infection of *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Letter*. 2011. 316: 36–43.
- Webber M. A, Piddock L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003. 51: 9-11.
- Webster J, Scuffham P, Sherriff KL, Stankiewicz M, Chaboyer WP. Negative pressure wound therapy for skin grafts and surgical wounds healing by primary intention (Review). *The Cochrane Library*. 2012, Issue 4.
- Westgate S.J, Percival S.L, Clegg P.D, Knottenbelt D.C, Cochrane C.A. Evidence and Significance of Biofilms in Chronic Wounds in Horses. Teoksesta Percival S.L, Derek C. Knottenbelt D.C, Cochrane C.A (toim.). *Biofilms and veterinary medicine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011b:147-166.
- Westgate S.J, Percival S.L, Knottenbelt D.C, Clegg P.D, Cochrane C.A. Microbiology of equine wounds and evidence of bacterial biofilms. *Veterinary Microbiology*. 2011a. 150: 152-159.
- Williams D.W, Lewis M.A.O, Percival S.L, Kuriyama T, de Silva S, Riggo M.P. Role of biofilms in the Oral Heal of Animals. Teoksesta Percival S.L, Derek C. Knottenbelt D.C, Cochrane C.A (toim.). *Biofilms and veterinary medicine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011:129-139.
- Wolcott R, Costerton J.W, Raoult D, Cutler S.J. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012. 10.1111/j.1469-0691.2012.04001.x.
- Wolcott R.D, Ehrlich G.D. Biofilms and Chronic Infections. *The Journal of the American Medical Association*. 2008. Vol. 299: 2682-2684.
- Yi L, Wang Y, Ma Z, Zhang H, Li Y, Zheng JX, Yang YC, Lu CP, Fan HJ. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*. *Pathogens and Disease*. 2013. 3:174-183.

Zechini B, Versace I. Inhibitors of Multidrug Resistant Efflux Systems in Bacteria. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. 2009. 4: 37-50.