



Teamwork in ziekmakende biofilms

Microbiële infecties zijn een belangrijke reden voor medisch handelen, zeker in de tandheelkunde. De ideeën over de rol die bacteriën spelen in het ontstaan van ziekten zijn de afgelopen eeuwen steeds veranderd. Tegenwoordig staan biofilms sterk in de belangstelling vanwege hun ziekmakende effect bij hechting op harde weefsels, orale implantaten en op knie-, heup- en stemprothesen. In biofilms functioneren en communiceren bacteriën in georganiseerde structuren, aangehecht aan een oppervlak. Een biofilm biedt bacteriën bescherming tegen het afweersysteem en antibacteriële middelen. Door inzicht te krijgen in het ontstaan en functioneren van biofilms kunnen betere antibacteriële therapieën worden ontwikkeld.

Zijnga V, Abbas F, Degener JE. Teamwork in ziekmakende biofilms
Ned Tijdschr Tandheelkd 2008; 115: 6-13

Inleiding

Bacteriën kunnen infecties veroorzaken. Meer dan 10% van de volwassenen leidt aan enige vorm van parodontale infecties. In de tandheelkunde zijn peri-implantitis, cariës en endodontale problemen eveneens het gevolg van bacteriën. Bij een groot aantal van deze microbiële infecties spelen meerdere soorten micro-organismen een rol. Als deze, zoals in de mond, aan een hard oppervlak zijn aangehecht, kan er sprake zijn van een biofilmgerelateerde infectie. In biofilms zijn bacteriën ingebed in een kleverige polymere matrix en aangehecht aan een oppervlak. Bij de mens vormen onder andere contactlenzen, hartkleppen, stemprothesen, katheters en prothetische voorzieningen oppervlakken waar biofilms aan hechten en ontstekingen kunnen veroorzaken. Het inzicht dat bacteriën zich organiseren in structuren door de vorming van een biofilm en als zodanig een rol spelen bij infecties, heeft pas de laatste decennia binnen de algemene geneeskunde een plaats gekregen. De effecten van biofilms (tandplaque) in de mond zijn echter al veel langer bekend en onderwerp van onderzoek. In het onderstaande wordt een beeld geschetst van wat biofilms zijn, waarbij de nadruk ligt op biofilms op de harde weefsels in de mond. Ten slotte worden alternatieve antibacteriële therapieën beschreven, gebaseerd op de kennis over de vorming, structuur en processen die optreden in biofilms.

Geschiedenis

De 17e eeuwse lakenkoopman Antonie van Leeuwenhoek gebruikte zijn zelfontwikkelde lenzen om geweven stoffen op hun kwaliteit te beoordelen. Met deze hoogwaardige lenzen ontdekte hij als eerste wat er nu eigenlijk in die witte plaque op onze tanden zit. Zijn 'dierkens' waren de eerste waarnemingen van bacteriën. Deze minuscule 'dierkens' werden pas 2 eeuwen later herontdekt door Louis Pasteur als de veroorzakers van ziektes. In 1884 stelde de Duitse arts Koch postulaten op waarmee verwekker en ziekte aan elkaar

konden worden gekoppeld (tab. 1). Met het aantonen van *Mycobacterium tuberculosis* en *Bacillus anthracis* als etiologische verwekkers van tuberculose en miltvuur bewees hij het gelijk van Pasteur. Er zijn echter ook infecties waarbij het onmogelijk is een enkele ziektekiem te isoleren. Deze poly-microbiële infecties voldoen niet altijd aan de postulaten van Koch (tab.1). Peritonitis is een voorbeeld van een poly-microbiële infectie van het buikvlies waarbij wel wordt voldaan aan de postulaten van Koch. De verschillende soorten bacteriën die uit peritonitis laesies konden worden geïsoleerd, werden getest in een muizenmodel op mortaliteit en vorming van abscessen. Hierbij bleek dat de gecombineerde aanwezigheid van de verschillende soorten leidde tot een significant verhoogde mortaliteit en vorming van meer abscessen vergeleken met de situatie waarbij slechts 1 soort werd getest (Brook et al, 1984). Andere voorbeelden van polymicrobiële infecties zijn vaginitis, sinusitis en parodontale aandoeningen.

Het ontbreken van één enkele soort verwekker bij parodontale aandoeningen heeft geleid tot de ontwikkeling van de 'niet-specifieke plaquehypothese'. In navolging van Miller, een student van Koch, zijn parodontale aandoeningen lange tijd beschouwd als het resultaat van de overgroei van de commensale flora (Loesche et al, 2001). Deze theorie heeft lange tijd het denken beïnvloed en is terug te vinden in de traditionele initiële behandeling van patiënten met paro-

Tabel. 1. De postulaten van Koch.

1. De ziektekiem wordt in grote hoeveelheden aangetroffen bij de patiënt.
2. De ziektekiem kan worden geïsoleerd en verder worden gekweekt.
3. Een proefdier dat met de gekweekte kiem wordt besmet, moet dezelfde ziekte krijgen.
4. De ziektekiem moet uit het proefdier kunnen worden geïsoleerd, en moet gelijk zijn aan de ziektekiem in het lichaam van de patiënt.

1. De aanwezigheid van bacteriën in de buurt van de laesie is hoger dan bij gezonde personen.
2. Patiënten die met de bacterie zijn geïnfecteerd, ontwikkelen hoge antilichaam titer in serum, speeksel en de gingivale creviculaire vloeistof.
3. Van de bacterie kan *in vivo* worden aangetoond dat deze virulentie factoren bezit die kunnen worden gecorreleerd met de klinische histopathologie.
4. Een proefdier dat met de bacterie wordt geïnfecteerd, ontwikkelt kenmerkende histopathologische symptomen.
5. Behandeling die leidt tot de eliminatie van deze bacterie resulteert in een klinische verbetering.

Tabel. 2. De postulaten van Socransky.

dontitis. Hierbij wordt gestreefd naar het onder controle krijgen van de infectie en het verlagen van de totale hoeveelheid bacteriën door het verwijderen van supra- en subgingivale plaque en het invoeren van een goede zelfzorg.

Socransky (1977) formuleerde 5 nieuwe postulaten om specifieke soorten bacteriën te relateren aan parodontitis (tab. 2). Uit onderzoek volgde dat *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Porphyromonas gingivalis* en *Tannerella forsythensis* moesten worden beschouwd als echte parodontale pathogenen. In 1998 werden 13.261 subgingivale plaquemonsters geanalyseerd op 40 soorten bacteriën met behulp van moleculaire DNA-technieken. Na analyse bleek 1 groep bacteriën sterk gerelateerd te zijn aan parodontitis. Deze groep wordt het 'red complex' genoemd en bestaat uit *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* en *Treponema denticola* (Socransky et al, 1998). Deze specifieke plaquehypothese is terug te vinden in de behandeling van bepaalde vormen van parodontitis, zoals refractaire en juveniele parodontitis. *Actinobacillus actinomycescomitans* en *Porphyromonas gingivalis* zijn geassocieerd met voortdurend verlies van aanhechting en een slechte respons op initiële therapie. Het identificeren van de aanwezige soorten door kweek of polymerasekettingreactie dient dan om deze soorten gericht te verwijderen door additionele antibiotica-therapie (Van Winkelhoff en Winkel, 2005).

Uit onderzoek is gebleken dat bacteriën niet alleen vrij rondzwemmen in een waterig medium zoals lange tijd werd gedacht, maar ook samengeklonterd zitten in slijmerige constructies die zijn gehecht aan een oppervlak (Costerton et al, 1978). Dit fenomeen werd voor het eerst ontdekt in bergbeekjes, maar komt onder meer ook voor in de mond, de luchtwegen en op implantaten in het lichaam. Een biofilm is een complexe architectuur waarin verschillende soorten bacteriën, virussen en schimmels samenleven. In de behandeling van biofilmgerelateerde aandoeningen dient daarom niet de afzonderlijke soort, maar de gehele biofilm als oorzaak te worden gezien.

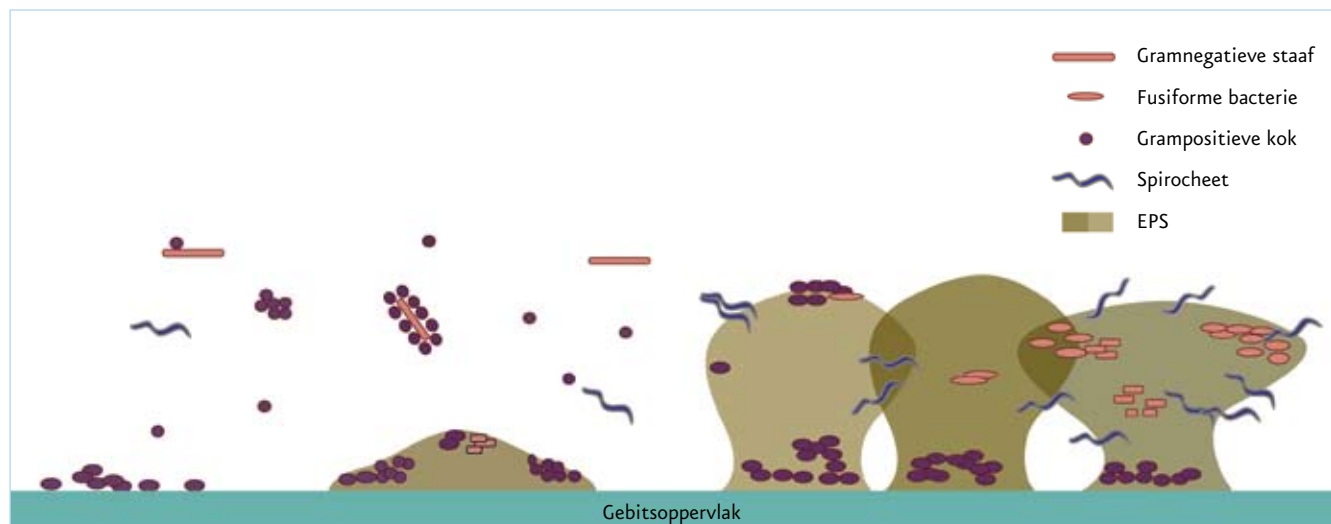
Diversiteit in biofilms

Moore en Moore (1994) kweekten uit supra- en subgingi-

vale plaquemonsters 509 verschillende soorten bacteriën. De schatting is dat deze 509 soorten ongeveer de helft zijn van de soorten die in de mond kunnen worden aangetroffen (Wilson et al, 1997). Met de introductie van kweekonafhankelijke moleculaire technieken is het aantal gevonden soorten in de mond verder uitgebreid (Kroes et al, 1999; Paster et al, 2001; Hutter et al, 2003) tot meer dan 700 (Aas et al, 2005). De geïdentificeerde bacteriën behoren tot 9 verschillende groepen: Deferribacteres, Spirocheates (*Treponema denticola*), Fusobacteria (*Fusobacterium nucleatum*), Actinobacteria (*Actinomyces neaslundii*), Firmicutes (*Streptococcus mutans*), Proteobacteria (*Actinobacillus actinomycescomitans*), Bacteroidetes (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*) en 2 groepen waarvan geen gekweekte soorten zijn beschreven (Paster et al, 2001). Hierbij moet worden aangetekend dat verschillende plaatsen in de mond zoals de tong, supra- en subgingivale plaque, harde tandweefsels en wangepitheel door verschillende groepen bacteriën en in wisselende aantallen worden gekoloniseerd (Mager et al, 2003). Het aantal verschillende soorten in een enkele pocket wordt geschat op minder dan 50 (Zijngje et al, 2003; Aas et al, 2005) en kan verschillen tussen bemonsterde locaties en tussen patiënten (Marsh et al, 1989; Socransky et al, 1998). De subgingivale microbiële diversiteit wordt mede bepaald door plaatsspecifieke kenmerken zoals pH, zuurstof, humane afweerfactoren en de beschikbaarheid van nutriënten (Sissons, 1997). Hoewel bacteriën kunnen worden beschouwd als pathogenen met als doel ziekte te veroorzaken, worden ze in beginsel gedreven door voedsel en vermeerdering. Inzicht in de sturende krachten achter bacteriële kolonisatie kan richting geven aan therapeutische middelen.

De vorming van een biofilm

In de ontwikkeling van biofilms kunnen 4 stadia worden onderscheiden die beginnen met de initiële hechting aan een oppervlak zoals beschreven in een overzichtsartikel door Stoodley et al (2002). De ontwikkeling van biofilms wordt schematisch weergegeven in afbeelding 1. In de mond vormt zich bijvoorbeeld op het harde tandweefsel een pellicle met glycoproteïnen, mucinen en enzymen, afkomstig uit speeksel. Deze eiwitten worden herkend door receptoren (fimbriae) op de bacteriecelwand. Streptokokken- en actinomycessoorten zijn de eerste kolonisten en binden zich aan een groot aantal substraten in het speeksel en op de gebitselementen (Kolenbrander en London, 1993; Jenkinson en Lamont, 1997). Als bacteriën eenmaal zijn aangehecht, worden genen voor het bewegen, het herkennen en het hechten aan substraten onderdrukt (Jefferson, 2004). Genen van belang voor de vorming van biofilm, zoals de productie van extracellulaire polysacchariden (EPS), worden actief (Stoodley et al, 2002). Uitbreiding van de biofilm vindt plaats door een combinatie van processen zoals verspreiding van cellen, celdeling van al aangehechte cellen en de aantrekking van cellen uit de omgeving. Bacteriën uit de omgeving kunnen direct hechten aan bacteriën in een bio-



Afb. 1. Schematische weergave van de vorming van een biofilm, met van links naar rechts de eerste aanhechting, de productie van extracellulaire polysacchariden (EPS) en uiteindelijk de volgroeide biofilm met holle ruimten en verschillende soorten bacteriën.

film (coadhesie) of eerst aan elkaar (coaggregatie), en dan aan een biofilm. Het onderliggende mechanisme is hetzelfde en bestaat meestal uit een lectinebinding tussen een eiwit op de ene cel dat een complementair carbohydraat op de celwand van een andere bacterie herkent. Een voorbeeld van coaggregatie is de zogenaamde 'corn-cob' of maïskolf (Listgarten, 1973). Deze bestaat uit filamenteuze bacteriën die zijn omringd door kokkoïde cellen. Coaggregatie en coadhesie zijn *in vitro* uitgebreid onderzocht, wat heeft geleid tot een schematisch biofilmmodel waarin *Fusobacterium nucleatum* een brugfunctie vervult tussen initiële hechters zoals streptokokken- en actinomycessoorten en late hechters zoals bacteroïdesoorten (afb. 2) (Kolenbrander en London, 1993). Of dit model ook de werkelijke structuur *in vivo* weergeeft, is onbekend.

Na het eerste stadium waarin de bacteriën zich hechten, volgt het tweede stadium waarin de aangehechte bacteriën EPS produceren, de slijmerige matrix die een biofilm zijn structuur geeft. De precieze structuur van de biofilm wordt bepaald door een aantal factoren, waaronder de expressie van genen voor de productie van EPS, specifieke oppervlakte-eiwitten en signaleiwitten. Daarbij spelen ook bacteriële interacties een rol, zoals mutualisme, commensalisme en competitie voor de aanwezige substraten (Wimpenny et al, 2000). Daarnaast zijn fysisch-chemische factoren van belang, zoals pH, zuurstof concentratie en de redoxpotentiaal.

In het derde en vierde stadium vindt maturatie van de biofilm plaats. Er ontstaan open ruimten en waterkanalen, en cellen en biomassa worden heterogeen verdeeld. Zonder de aanwezigheid van laminaire stroming ontstaan paddestoelachtige structuren (afb. 1), terwijl met het toenemen van de stroming de biofilm een meer filamenteuze structuur krijgt. Dit past goed bij supragingivale biofilms die blootstaan aan speeksel en crevulaire vloeistofstroming. Over de vorm en structuur van subgingivale biofilms is veel minder bekend (Costerton et al, 1995). Ook orale biofilms

vertonen een specifieke architectuur met holle ruimten en kanalen (Wood et al, 2000) en een heterogene distributie van bacteriën (Omar et al, 1990; Kigure et al, 1995; Crespi et al, 1996). Het is nog grotendeels onbekend waar in een orale biofilm zich de verschillende bacteriën bevinden. Als er veranderingen optreden in het milieu of de beschikbaarheid van nutriënten, kan een biofilm uiteindelijk weer loskomen van het oppervlak en verdwijnen.

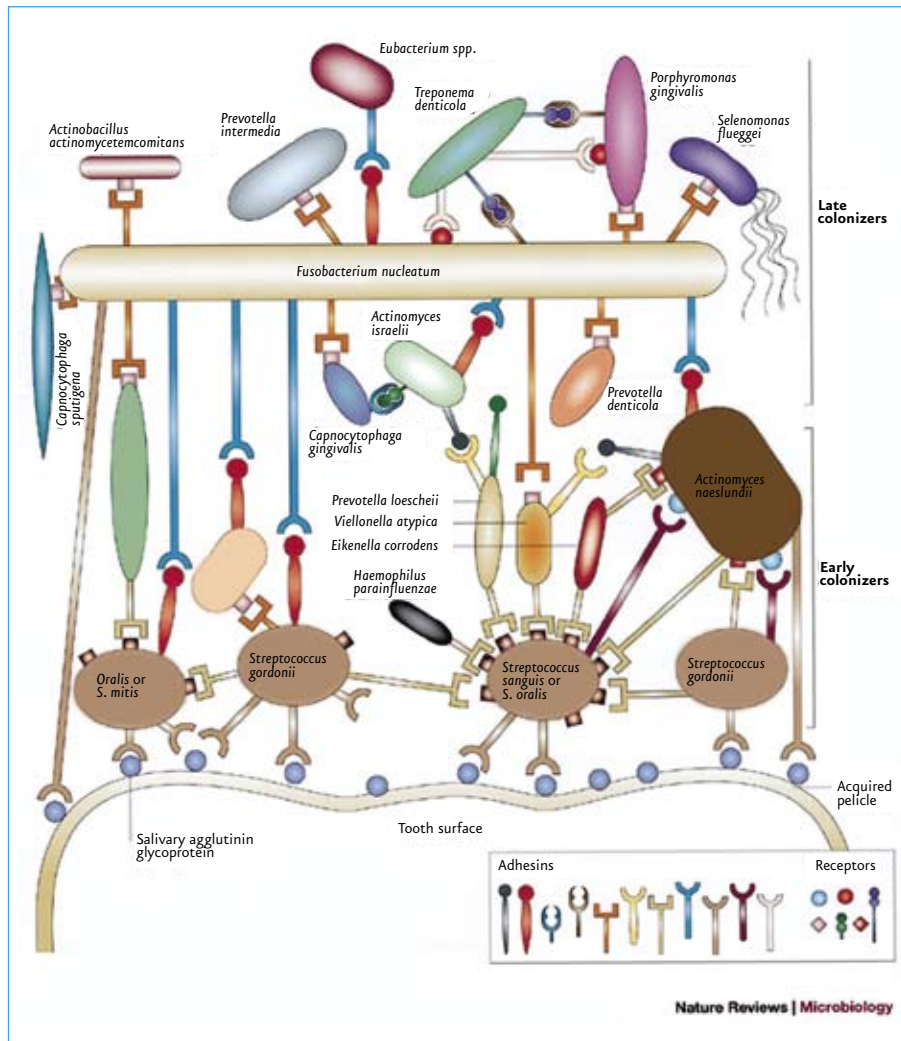
Bacterietaal

Een georganiseerde structuur, zoals een biofilm, is alleen mogelijk als er sprake is van communicatie. Vormen van communicatie die worden gevonden bij bacteriën zijn metabole communicatie, cel-celherkenning, uitwisseling van genetisch materiaal tussen soorten en de productie van signaalmoleculen (Kolenbrander, 2000; Kolenbrander et al, 2002).

Vooral de productie van signaalmoleculen vormt een interessant aspect van biofilms. Bacteriën scheiden zogenaamde signaalstoffen (feromonen) af. Als deze een zekere concentratie hebben bereikt, leidt dat tot het aan- of uitzetten van de expressie van genen van omringende cellen. Dit proces heet 'quorumsensing' (QS).

Er worden 3 soorten QS-systemen onderscheiden. Het eerste is het LuxR/I-systeem dat bestaat uit een acyl-homoserine lacton (AHL) molecuul dat bijvoorbeeld de productie van afweerstoffen kan verstoren (Reading en Sperandio, 2006).

Het tweede QS-systeem is het LuxS-communicatiesysteem dat onder meer wordt gebruikt door de orale bacteriesoorten *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* en *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Frias et al, 2001; Chung et al, 2001; Fong et al, 2001; Yuan et al, 2005). Deze bacteriën zijn hierdoor in staat de hoeveelheid hemine en ijzer in het milieu te meten en de productie van eiwitten daarop aan te passen. Dit heeft ook gevolgen voor de productie van virulentiefactoren zoals het leukotoxine van *Actinobacillus actinomycetemcomitans* dat



Afb. 2. Schematische weergave van een orale biofilm met initiële hechters en bacteriën die later aanhechten gebaseerd op *in vitro* coaggregatie en cohesie experimenten. (Met toestemming overgenomen uit Bakaletz, 2004.)

actief de leukocyten en neutrofielen doodt en de verhoogde resistentie van *Porphyromonas gingivalis* tegen de afweer van de gastheer.

Het derde systeem is gebaseerd op peptiden die – afhankelijk van de concentratie – de transcriptie van genen reguleren. Dit systeem regelt bij streptokokken de competentie om DNA op te nemen. Hierdoor kunnen cellen zich beter aanpassen aan hun omgeving. Daarnaast spelen deze zogenaamde ‘competence stimulating peptides’ (CSP) een rol bij de vorming van biofilms, zuurtolerantie en de productie van virulentie factoren.

Waarom vormen bacteriën een biofilm?

Uit het voorgaande blijkt dat de microbiële populatie in een biofilm uit een groot aantal verschillende soorten bestaat met een onderlinge communicatie. Maar waarom vormen bacteriën biofilms? Ten eerste bieden biofilms bescherming tegen de immuunrespons van de gastheer en tegen antibiotica. Ten tweede zijn biofilms van belang voor het in bezit nemen en in bezit houden van nutriëntrijke milieus (Jeferson, 2004).

Biofilm en immuunrespons

De immuunrespons van de gastheer moet bescherming bieden tegen de invasie van bacteriën. Hierbij speelt zowel de aspecifieke *cellulaire* afweer als de specifieke *humorale* afweer een rol.

De cellulaire afweer bestaat uit het fagocyteren van bacteriën door neutrofielen en macrofagen. Bacteriën in biofilms zijn echter in staat fagocytose door leukocyten en macrofagen te ontlopen. De extracellulaire slijmproductie interfereert namelijk met de fagocytose door neutrofielen (Shiau en Wu, 1998) en daarnaast is het voor leukocyten onmogelijk om de biofilm te penetreren (Steward en Costerton, 2001). Bovendien zijn de bacteriën in de biofilm in staat om de functie van leukocyten en macrofagen te moduleren, waardoor de biofilm kan blijven bestaan (DeLeo, 2004). *Actinobacillus actinomycescomitans* (Permpnich et al, 2006) en *Porphyromonas gingivalis* (Lamont en Jenkinson, 1998) zijn voorbeelden van

paropathogenen die fagocytose kunnen ontwijken en de routing van leukocyten kunnen moduleren.

De humorale afweer van het lichaam bestaat uit een ontstekingsreactie die op gang wordt gebracht door pro-inflammatoire cytokinen, die door lichaamscellen worden geproduceerd bij contact met bacterieproducten. Daarnaast bezit het lichaam antigeenpresenterende cellen zoals macrofagen, dendritische cellen en B-cellen. Deze presenteren lichaamsvreemde eiwitten aan T-cellen zodat een specifieke afweerreactie in gang wordt gezet voor het effectief verwijderen van de bacteriën. De bacteriën in een biofilm hebben echter sterke verdedigingsmechanismen tegen deze humorale afweer. Van *Staphylococcus aureus* in een biofilm is bijvoorbeeld aangetoond dat deze bacterie sneller gaat groeien als reactie op pro-inflammatoire cytokinen (McLaughlin en Hoogewerf, 2006). Van *Porphyromonas gingivalis* in de tandplaque is bekend dat deze de productie van zowel pro- als anti-inflammatoire cytokinen kan reguleren en ook enzymen heeft om cytokinen af te breken en zo de afweerreactie kan verstoren (Fletcher et al, 1998; Lamont en Jenkinson, 1998).

Bacteriën in een biofilm zijn tot slot ook minder gevoelig voor antibiotica doordat de antimicrobiële stoffen minder goed kunnen diffunderen in de biofilm. Daarnaast verkeren groepen cellen van dezelfde soort in diverse groeistadia of hebben ze mutaties ondergaan (Lewis, 2001), waardoor antibiotica op deze cellen minder effect hebben. Vooral bacteriën in gematureerde biofilms hebben een grote resistentie opgebouwd. Zo heeft *Porphyromonas gingivalis* in de tandplaque vergeleken met de vrijzwevende cellen een sterk verhoogde resistentie voor amoxicilline, doxycycline en metronidazol (Larsen, 2002).

Biofilm en nutriëntrijke milieus

Het menselijk lichaam is een aangename locatie voor bacteriën. Het is er vochtig, warm en rijk aan nutriënten en, afgezien van het afweersysteem, een ideale plek voor bacteriën om te leven. Met behulp van chemoreceptoren op de celwand kunnen bacteriën de fysiologische eigenschappen van hun omgeving meten, zoals de aanwezigheid van nutriënten, de pH, de zuurstofspanning en de redoxpotential. Met behulp van flagellen kunnen ze in de richting van een optimale niche bewegen (Alexandre et al, 2004). Als bacteriën een aantrekkelijke niche detecteren, hechten ze aan een oppervlak of een biofilm. De verschillende soorten bacteriën zijn gespecialiseerd in verschillende stappen in de enzymatische afbraak van complexe nutriënten zoals mucinen, glycoproteïnen en eiwitten (Kolenbrander, 2000; O'Toole et al, 2000; Jenkinson en Lamont, 2005). Eenmaal gevestigd in een biofilm kunnen bacteriën elkaars eigenschappen aanvullen, waardoor ze efficiënter complexe substraten kunnen afbreken, zoals humane glycoproteïnen.

De behandeling van biofilmgerelateerde aandoeningen

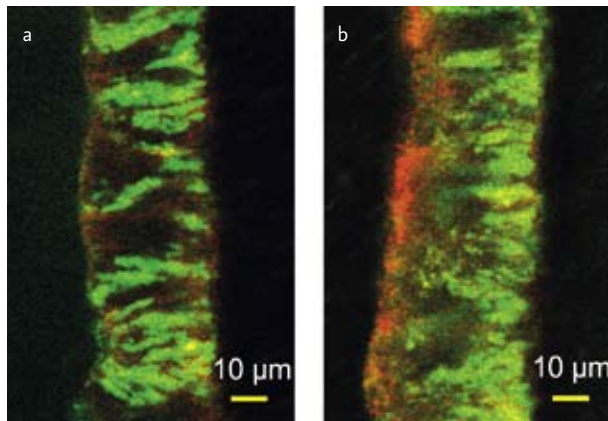
Biofilms vormen duidelijk een andere entiteit dan los zwevende cellen. Biofilms bestaan uit een extrapolymere matrix waarin verschillende soorten bacteriën samenleven en communiceren. Ze vormen voor bacteriën een beschermd milieu waarin ze optimaal gebruik kunnen maken van de aanwezige nutriënten en dat bescherming biedt tegen het afweersysteem van de gastheer of antibacteriële therapie. Met het beschreven beeld van wat biofilms zijn, is het mogelijk om het effect van antibacteriële therapie in te schatten en aanwijzingen te geven hoe deze het beste kan worden ingesteld.

Plaquevorming, feitelijk de vorming van een biofilm, staat aan de basis van cariës, endodontale problemen, gingivitis en parodontitis. Maar ook infecties aan bijvoorbeeld hartkleppen, katheters, een stem en orthopedische prothesen kunnen een gevolg zijn van biofilms. Plaquecontrole vormt derhalve een essentieel onderdeel van zowel de tandheelkunde als de geneeskunde. In de tandheelkunde wordt plaque bestreden door middel van mechanische verwijdering, mondspoelmiddelen en antibiotica. De mechanische verwijdering van plaque leidt aantoonbaar tot een afname van bloeding, pocketdiepte en aanhechtingsverlies (Cobb

et al, 2002; Van der Weijden en Timmerman, 2002). Het effect van alleen mondspoelmiddelen op plaque is minder eenduidig. Dit komt omdat veel onderzoeken naar de effecten van mondspoelmiddelen te kort (< 6 maanden) zijn, mondspoelmiddelen met elkaar worden vergeleken in de aanwezigheid van mechanische reiniging, een controlegroep ontbreekt, het onderzoek niet geblindeerd en gerandomiseerd is, of retrospectief is. Het biofilmconcept impliceert dat gematureerde biofilms verminderd gevoelig zullen zijn voor de effectieve bestanddelen in de spoelmiddelen. Dit wordt onderstreept door *in vitro*-onderzoek waarin het effect van chloorhexidine beperkt blijft tot de bovenste lagen van een biofilm (afb. 3) (Zaura-Arite, 2001) en slechts een tijdelijk effect sorteert (Pratten et al, 1998). Na mechanische verstoring van de volgroeide biofilm is te verwachten dat het antibacteriële effect van mondspoelmiddelen groter is. Gebleken is ook dat vrijwilligers na professionele mondreiniging vrij van plaque en gingivitis bleven door alleen te spoelen met chloorhexidine (Løe en Schiott, 1970). Spoelmiddelen hebben naast mechanische reiniging wel een toegevoegd effect op plaquecontrole en de reductie van gingivitis, waarbij chloorhexidine het grootste effect sorteert, zoals uitgebreid is samengevat door Paraskevas (2005). Over het effect van chloorhexidine op de preventie en reductie van cariës kunnen nog geen sluitende uitspraken gedaan worden (Twetman, 2004).

Zoals eerder beschreven zijn bacteriën in biofilms resistentier tegen antibiotica dan vrij rondzwemmende bacteriën. Voor *Porphyromonas gingivalis* is aangetoond dat deze in biofilms 4 tot 8 maal resistentier is tegen metronidazol en amoxicilline en 64 maal resistentier tegen doxycycline. Over de resistentie van andere orale micro-organismen in biofilms is nog weinig bekend. Het biofilmconcept geeft echter duidelijk aan dat het toepassen van antibiotica effectiever is na mechanische verstoring van de biofilm. Loesche (1994) en de American Association of Periodontology (1996) adviseren daarom alleen antibiotica voor te schrijven na de mechanische verwijdering van plaque, bij patiënten met een goede mondhygiëne en ondersteund met het nogmaals reinigen van de pockets.

De richtlijnen en het nut van de toepassing van antibiotica bij parodontale infecties zijn uitgebreid beschreven door Van Winkelhoff en Winkel (2005). Illustratief is het onderzoek van Pähkla et al (2005) waaruit blijkt dat de systemische toediening van 3 maal daags 500 mg metronidazol resulteert in 15-20 µg/ml metronidazol in de pocket. De minimum remmende concentratie (MIC) ligt tussen de 0,01 en 0,1 µg/ml voor de meeste paropathogenen en lijkt dus ruim te worden gehaald. *In vitro* biofilms van *Porphyromonas gingivalis* worden echter slechts gedeeltelijk in hun groei geremd door 20 µg/ml metronidazol (Wright et al, 1997). Gezien de verhoogde resistentie van bacteriën in biofilms tegen antibiotica is het dus van belang de voorgescreven concentraties antibiotica aan te houden en vooral niet te laag te doseren.



Afb. 3. Confocale Laser Scanning Microscopie (CLSM) opname van een 24-uur oude biofilm na kleuring met een live (green)-dead (red) stain. De groene fluorescentie zijn levende bacteriën en de rode cellen zijn dode bacteriën. Afb. a laat een onverstoorde biofilm zien en b laat een biofilm zien die met chloorhexidine is behandeld. Duidelijk zichtbaar is het oppervlakkige effect van chloorhexidine. (Met toestemming overgenomen uit Zaura-Arite et al, 2001.)

Samenvattend kan worden geconcludeerd dat controle van tandplaque- of biofilm het meest effectief is door de mechanische verwijdering van beide. Dit kan worden aangevuld met spoelmiddelen, waarbij het grootste effect wordt bereikt met chloorhexidine. Voor de verwijdering van specifieke pathogenen kunnen antibiotica worden voorgeschreven. Dit dient na de mechanische verwijdering van plaque te gebeuren op geleide van een bacteriologische analyse. Zonder mechanische verstoring van de plaque of bij onvoldoende plaquecontrole moet het voorschrijven van spoelmiddelen of antibiotica als minder zinvol worden beschouwd. Helaas geldt dat ook voor het behandelen van geïnfecteerde prothetische voorzieningen elders in het lichaam. Het mechanisch reinigen vereist daarbij meestal een ingrijpende operatie, terwijl de behandeling met antibiotica vaak langdurig en belastend is voor de patiënt, zonder dat altijd het gewenste effect wordt bereikt.

De toekomst

Het beschreven biofilmmodel biedt aanknopingspunten voor alternatieve antibacteriële therapie, zoals het tegengaan van de aanhechting op een oppervlak, het ingrijpen in het metabolisme van bacteriën, het vervangen van schadelijke bacteriën of het interfereren in de bacteriële communicatie.

Zo kan de hechting van een biofilm op een oppervlak worden tegengegaan door bijvoorbeeld heupprothesen eenmalig te coaten met quaternair ammonium silaan of door het toevoegen van biosurfactanten aan tandpasta (Gottenbos et al, 2002; Hoogmoed et al, 2006).

Het optimaal benutten van de aanwezige nutriënten is een van de redenen van bacteriën om biofilms te vormen. Kennis van het metabolisme van de biofilmbacteriën biedt mogelijkheden om het functioneren van een biofilm te verstoren. De tandplaque is hiervan een voorbeeld. Cariës is het gevolg van de omzetting van suikers in zuren door bacteriën in de tand-

plaque. Het modifieren van het bacterieel metabolisme door het wegnemen van suikers leidt tot een reductie van cariës.

Het vervangen van schadelijke bacteriën in de biofilm door onschadelijke bacteriën wordt al langer toegepast voor het verbeteren van de microbiota in de darm. Voedingsmiddelen zoals Yakult® – dit bevat *Lactobacillus casei shirota* – worden gepropageerd voor onder andere het stimuleren van de afweer, het voorkomen van kanker en allergieën en het verbeteren van de stoelgang. Ook blijkt Yakult Light® de biofilmvorming op stemprothesen te verminderen en daardoor de levensduur ervan te verlengen (Schwandt et al, 2006). Het toepassen van deze zogenaamde probiotica is nu ook voor de mond in opkomst. Zo is *Streptococcus salivarius* K12 getest bij patiënten met halitose. Deze initiële hechter produceert weinig vluchtige zwavelverbindingen en voorkomt dat de aan halitosis gerelateerde microbiota zich na het mechanisch en chemisch reinigen van de mond weer opnieuw kunnen vestigen in de mond. Na 1 week bleek er een reductie te zijn opgetreden in de hoeveelheid geproduceerde vluchtige zwavelverbindingen (Burton et al, 2006). Ook voor de preventie van cariës is het vervangen van cariogene door minder cariogene bacteriën onderwerp van onderzoek (Caglar et al, 2005).

Futuristisch is het ingrijpen in de communicatie tussen bacteriën. Deze communicatie kan worden verstoord door de productie van acyl-homoserine lacton (AHL), een stof die een rol speelt bij de communicatie tussen bacteriën, te blokkeren met L/D-S-adenosylhomocysteïne. Daarnaast kan het AHL geïnactiveerd worden door lactonolyse door het bacteriële enzym aiiA. Een derde mogelijkheid is het toepassen van stoffen die analoog zijn aan AHL en de AHL-receptor in bacteriën blokkeren. Deze kunnen worden gesynthetiseerd of in de natuur worden aangetroffen bij planten en schimmels zoals gehalogeneerd furanon en knoflookextract. De verstoorde communicatie zorgt ervoor dat de vorming van een biofilm onvolledig is. Het immuunsysteem zou dan beter in staat zijn een biofilm op te ruimen. Getest in een muizenmodel met een longinfectie door *Pseudomonas aeruginosa* bleken deze stoffen de mortaliteit van de muizen te verlagen en het aantal bacteriën in de longen te verminderen (Rasmussen en Givskov, 2006). Recent is een synthetische peptide, een zogenaamd 'selectively targeted antimicrobial peptide' (STAMP), ontwikkeld dat specifiek het CSP van *Streptococcus mutans* – dat een rol speelt bij de communicatie tussen bacteriën en biofilmvorming – gebruikt als doel. Hierdoor wordt de *Streptococcus mutans* selectief gedood in een biofilm. Hoewel dergelijk onderzoek veelbelovend lijkt, is er nog geen klinisch onderzoek gedaan naar het effect van deze stof op *Streptococcus mutans* in de mond (Eckert et al, 2006).

Epiloog

Biofilms in de mond en elders in het lichaam vertonen overeenkomsten in het ontstaan en de functie, en dus ook in de mogelijkheden om ze te bestrijden. Door de toegenomen kennis over biofilms kunnen antibacteriële therapieën beter worden ingesteld. Onderzoek naar biofilms in de mond

heeft duidelijk gemaakt dat de mechanische verwijdering van de biofilm (plaque) het meest effectief is. Helaas is dit niet met alle biofilms in het lichaam mogelijk. Dank zij de toenemende kennis over biofilms zijn nieuwe vormen van anti-biofilmtherapie in ontwikkeling. Deze zullen in de toekomst ook hun toepassing vinden in de mond.

Literatuur

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5721-5732.
- Alexandre G, Greer-Phillips S, Zhulin IB. Ecological role of energy taxis in microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28: 113-126.
- Systemic antibiotics in periodontics. *J Periodontol.* 1996; 67: 831-838.
- Bakaletz LO. Developing animal models for polymicrobial diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 552-568.
- Brook I, Hunter V, Walker RI. Synergistic effect of *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium* and anaerobic cocci and aerobic bacteria on mortality and induction of subcutaneous abscesses in mice. *J Infect Dis* 1984; 149: 924-928.
- Burton JP, Chilcott CN, Moore CJ, Speiser G, Tagg JR. A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. *J Appl Microbiol* 2006; 100: 754-764.
- Chung WO, Park Y, Lamont RJ, McNab R, Barbieri B, Demuth DR. Signaling system in *Porphyromonas gingivalis* based on a LuxS protein. *J Bacteriol* 2001; 183: 3903-3909.
- Crespi R, Covani U, Margarone JE, Andreana S. Topographic distribution of subgingival plaque along root surfaces of human periodontally diseased teeth. A descriptive study. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 698-703.
- Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. *J Clin Periodontol* 2002; 29 suppl 2: 6-16.
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am* 1978; 238: 86-95.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 711-745.
- DeLeo FR. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. *Apoptosis* 2004; 9: 399-413.
- Eckert R, He J, Yarbrough DK, Qi F, Anderson MH, Shi W. Targeted killing of *Streptococcus mutans* by a pheromone-guided 'smart' antimicrobial peptide. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3651-3657.
- Fletcher J, Nair S, Poole S, Henderson B, Wilson M. Cytokine degradation by biofilms of *Porphyromonas gingivalis*. *Curr Microbiol* 1998; 36: 216-219.
- Fong KP, Gao L, Demuth DR. luxS and arcB control aerobic growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* under iron limitation. *Infect Immun* 2003; 71: 298-308.
- Frias J, Olle E, Alsina M. Periodontal pathogens produce quorum sensing signal molecules. *Infect Immun* 2001; 69: 3431-3434.
- Gottenbos B, Busscher HJ, Mei HC van der, Nieuwenhuis P. Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. *J Mater Sci Mater Med* 2002; 13: 717-722.
- Hoogmoed CG van, Dijkstra RJ, Mei HC van der, Busscher HJ. Influence of biosurfactant on interactive forces between mutans *Streptococci* and enamel measured by atomic force microscopy. *J Dent Res* 2006; 85: 54-58.
- Hutter G, Schlagenhaut U, Valenza G, et al. Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens. *Microbiology* 2003; 149: 67-75.
- Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* 2004; 23: 163-173.
- Jenkinson HF, Lamont RJ. Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 8: 175-200.
- Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol* 2005; 13: 589-595.
- Kigure T, Saito A, Seida K, Yamada S, Ishihara K, Okuda K. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. *J Periodontal Res* 1995; 30: 332-341.
- Kroes I, Lepp PW, Relman DA. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 14547-14552.
- Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 1993; 175: 3247-3252.
- Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 413-437.
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66: 486-505.
- Loe H, Schiott CR. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res* 1970; 5: 79-83.
- Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 1244-1263.
- Larsen T. Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. *Oral Microbiol Immunol* 2002; 17: 267-271.
- Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 999-1007.
- Listgarten MA, Mayo H, Amsterdam M. Ultrastructure of the attachment device between coccal and filamentous microorganisms in 'corn cob' formations of dental plaque. *Arch Oral Biol* 1973; 18: 651-656.
- Loesche WJ, Grossman NS. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 727-52.
- Loesche WJ, Giordano JR. Metronidazole in periodontitis V: debridement should precede medication. *Compendium* 1994; 15: 1198-1218.
- Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 644-654.
- Marsh PD, Featherstone A, McKee AS, Hallsworth AS, Robinson C, Weatherell JA, Newman HN, Pitter AF. A microbiological study of early caries of approximal surfaces in schoolchildren. *J Dent Res.* 1989; 68: 1151-1154.
- McLaughlin RA, Hoogewerf AJ. Interleukin-1beta-induced growth enhancement of *Staphylococcus aureus* occurs in biofilm but not planktonic cultures. *Microb Pathog* 2006; 41: 67-79.
- Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5: 66-77.
- Omar AA, Newman HN, Bulman J, Osborn J. Darkground microscopy of subgingival plaque from the top to the bottom of the periodontal pocket. *J Clin Periodontol* 1990; 17: 364-370.

- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 49-79.
- Paster, BJ, Boches SK, Galvin JL, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001; 183: 3770-3783.
- Permpanich P, Kowolik MJ, Galli DM. Resistance of fluorescent-labelled *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains to phagocytosis and killing by human neutrophils. *Cell Microbiol* 2006; 8: 72-84.
- Pratten J, Smith AW, Wilson M. Response of single species biofilms and microcosm dental plaques to pulsing with chlorhexidine. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 453-459.
- Rasmussen TB, Givskov M. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology* 2006; 152: 895-904.
- Reading NC, Sperandio V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 254: 1-11.
- Robinson C, Strafford S, Rees G, et al. Plaque biofilms: the effect of chemical environment on natural human plaque biofilm architecture. *Arch Oral Biol* 2006; 51: 1006-1014.
- Schwandt LQ, Weissenbruch R van, Mei HC van der, Busscher HJ, Albers FW. Effect of dairy products on the lifetime of Provox2 voice prostheses *in vitro* and *in vivo*. *Head Neck* 2005; 27: 471-477.
- Shiau AL, Wu CL. The inhibitory effect of *Staphylococcus epidermidis* slime on the phagocytosis of murine peritoneal macrophages is interferon-independent. *Microbiol Immunol* 1998; 42: 33-40.
- Sissons CH. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res* 1997; 11: 110-126.
- Socransky SS. Microbiology of periodontal disease - present status and future considerations. *J Periodontol* 1977; 48: 497-504.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134-144.
- Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 14: 135-138.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 187-209.
- Twetman S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Res* 2004; 38: 223-229.
- Weijden GA van der, Timmerman MF. A systematic review on the clinical efficacy of subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002; 29 Suppl 3: 55-71.
- Winkelhoff AJ van, Winkel EG. Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontol* 2000 2005; 39: 40-52.
- Wilson MJ, Weightman AJ, Wade WG. Applications of molecular ecology in the characterisation of uncultured microorganisms associated with human disease. *Rev Med Microbiol* 1997; 8: 91-101.
- Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* 2000; 24: 661-671.
- Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res* 2000; 79: 21-27.
- Wright TL, Ellen RP, Lacroix JM, Sinnadurai S, Mittelman MW. Effects of metronidazole on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *J Periodontal Res* 1997; 32: 473-477.
- Yuan L, Hillman JD, Progulsk-Fox A. Microarray analysis of quorum-sensing-regulated genes in *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 2005; 73: 4146-4154.
- Zaura-Arite E, Marle J van, Cate JM ten. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 2001; 80: 1436-1440.
- Zijngge V, Harmsen HJ, Kleinfelder JW, ME van der, Degener JE, Welling GW. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis to study bacterial community structure in pockets of periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 59-65.

Summary

Strength in numbers: illness-causing biofilms

Microbial infections constitute an important reason for medical treatment, especially in dentistry. Ideas about the role played by bacteria in the development of diseases have changed steadily during the past centuries. At the present time much attention is being devoted to the role of biofilms due to their illness-causing influence with respect to stitches on hard tissue and on oral implants, knee-, hip-, and voice prostheses. In biofilms, bacteria function and communicate in organized extrapolymeric structures, attached to a surface. Biofilms provide bacteria with protection against the host's immune system and antibacterial chemicals. By gaining insights into the creation and functioning of biofilms, it will be possible to develop better antibacterial therapies.

Bron

V. Zijngge^{1,2}, F. Abbas², J.E. Degener¹
Uit ¹de afdeling Medische Microbiologie en ²het Academisch Centrum Mondzorg Groningen van het Universitair Medisch Centrum Groningen
Datum van acceptatie: 13 september 2007
Adres: prof.dr. J. E. Degener, UMC Groningen, Hanzeplein 1, 9700 RB Groningen
J.E.Degener@mmb.umcg.nl