

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 25:

Základy klinické mikrobiologie I
(ekologie, mikroflóra, biofilm)

Ondřej Zahradníček 777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz ICQ 242-234-100

S využitím materiálů prof. Miroslava Votavy, ing.
Veroniky Holé a dr. Lenky Černožorské

Co nás dnes čeká

- Povídání o **vztazích mezi organismy**
- Povídání o **normální mikroflóře organismu obecně**
- Povídání o **normální mikroflóře jednotlivých částí těla**
- Rozvedení povídání o **biofilmu (o kterém už byly zmínky dříve)**

Mikro- ekologie

Vztahy mezi organismy obecně

Ekologie je věda o vztazích mezi organismy navzájem a mezi organismy a prostředím

Symbióza v širším slova smyslu znamená jakékoli těsné soužití dvou rozdílných organismů

Symbióza v užším smyslu znamená pouze vzájemně prospěšné soužití obou organismů (také **mutualismus**, oba partneři mají ze soužití užitek a často nemohou mimo ně přežít, např. houba + řasa = lišejník)

Případ, kdy jeden organismus druhému škodí, se pak nazývá **antibióza** (a případná látka za ni zodpovědná je antibiotikum)

Vztah může být také **indiferentní**

Potravní vztahy dvou organismů

Komezalizismus – „sdílení jídelního stolu“ (mensa).
Například potraviny, které sníme, využívají i mikroby našeho střeva

Saprophytismus – využívání odumřelých částí organismů či celých odumřelých organismů (odloupaných epitelii či celých mrtvých těl)

Predace – organismus se živý jiným živým organismem (lev – antilopa)

Parazitismus – případ, kdy jeden organismus žije na úkor druhého a napadá jeho živé buňky, ne však s cílem rychlého usmrcení (jako u predace), ale s cílem dlouhodobého přežití tímto způsobem (jmelí – stromy). **Sem patří i mnohé medicínsky významné mikroby.**

Vztah parazit × hostitel

Je dynamický a je ovlivňován prostředím



Pro parazita je zpravidla nejvýhodnější situace, kdy **hostitel přežije, ale nesnaží se parazita zbavit**

Pro hostitele je ale **živení parazita nevýhodné**, snaží se ho tedy zbavit – zničit, odstranit, nebo aspoň lokalizovat



Saprofyt: *Proteus* se podílí na likvidaci
ne strávených bílkovinných zbytků potravy

Běžná

flóra

Normální mikroflóra a její význam

- Na různých místech lidského těla je přítomna tzv. **normální (běžná) flóra či mikroflóra.**
- Je tvořena **komenzálními či saprofytickými mikroby**, které jsou hostiteli více či méně prospěšné:
 - kolonizací příslušné sliznice **brání tomu, aby byla osídlena patogeny**
 - podílejí se na **stavu mikroprostředí**, např. pH
 - ve střevě **likvidují nestravitelné zbytky**
 - mohou mít i **další pozitivní efekty** pro hostitele (např. tvorba vitamínů střevními bakteriemi)

Kde mikroflóra je a kde není

- **Mikroflóra není** ve tkáních, v parenchymu orgánů, v krvi, v mozku ani mozkomíšním moku. Zde je každý nalezený mikrob velmi pravděpodobně patogenem
- **Mikroflóra není** ani v některých dutých orgánech, např. v jícnu, v plicích, v močovém měchýři (kromě starých osob) či v děloze
- **Mikroflóra je** zejména v dutině ústní a hltanu, v tlustém (a zčásti i tenkém) střevě, v pochvě a v menším množství také na kůži

Mikroflóra jako ekosystém

- Kdysi lidé mysleli, že všechny škůdce úrody jednoduše zahubí například DDT. Ukázalo se ale, že takový **brutální zásah často nadělá víc škody než užitku**, zvláště když se použije nevhodným způsobem
- Podobně **složitý ekosystém je i třeba střevní mikroflóra**. I proto dnes na střevní infekce většinou nedoporučujeme antibiotika, protože systém „rozhodí“ často ještě víc.

Přehled běžné mikroflóry

Kůže, nos, boltec, zevní zvukovod, kožní adnexa

Stafylokoky (i zlaté), korynebakteria, kvasinky

Hltan a ústní dutina

Ústní streptokoky a neisserie
Hemofily, malá množství pneumokoků, meningokoků, anaeroby, nepat. treponem.

Tlusté (i tenké) střevo

Anaeroby, enterobakterie, enterokoky, *Entamoeba coli*

Vagina

Laktobacily, malá množství nejrůznějších mikrobů

Přechody (rty apod.)

Směs zástupců obou míst

Normální osídlení dýchacích cest

- **Nosní dutina** nemá specifickou flóru, přechází tam však mikroflóra z kůže (přední část) a hltanu (zadní část)
- **V hltanu** (stejně jako v ústní dutině) nacházíme ústní streptokoky, neisserie, nevirulentní kmeny hemofilů aj. Mnohé další tam jsou, ale většinou je nevykultivujeme
- **Plíce a dolní dýchací cesty** jsou normálně bez většího množství mikrobů
- **Na ostatních místech** (hrtan) jsou různé přechody (hrtan – jako v hltanu, ale méně)

Normální osídlení trávicích cest

- **Rty** znamenají přechod kožní a ústní flóry
- **V ústní dutině** (stejně jako v hltanu) nacházíme ústní streptokoky, neisserie, nevirulentní kmeny hemofilů aj. Mnohé další tam jsou, ale většinou je nevykultivujeme
- **Jícen a žaludek** jsou za normálních okolností bez většího množství mikrobů
- **V tenkém a zejména tlustém střevě** nacházíme zpravidla asi 1 kg anaerobů, dále enterobakterie, enterokoky, kvasinky, někdy i nepatogenní améby
- **Řiť** je opět místem přechodu střeva a kůže

Normální situace v ústní dutině

- Ústní dutina je i za normální situace velice **složitý ekosystém**, složený z různých druhů bakterií, usazených materiálů, lidských buněk a dalších složek
- Bakterie se v dutině ústní přitom nevyskytují v nějakém chaosu, ale v komplikovaném, **strukturovaném útvaru, zvaném biofilm**.
V daném případě jde o vícedruhový strukturovaný biofilm, ve kterém např. anaeroby jsou přítomny ve větší hloubce než aerobní bakterie

Močové cesty zdravého člověka

Ledviny – normálně bez mikrobů

Pánvičky ledvinné – normálně bez mikrobů

Močovody (uretery) – normálně bez mikrobů

Močový měchýř mladých a středně starých osob – normálně bez mikrobů

Močový měchýř seniorů – i za normálních okolností může být osídlen mikroflórou, která nečiní problémy a stává se „běžnou flórou“

Močová trubice – normálně bez mikrobů, část přilehlá k ústí však může být osídlena zvenčí

Normální stav pohlavních orgánů

- Za normálních poměrů nejsou mikroby
 - **U ženy** v děloze, vejcovodech, vaječnicích
 - **U muže** v prostatě, chámovodech, varlatech
- Specifickou normální flóru má **vagina** (laktobacily, příměs různých aerobních i anaerobních mikrobů)
- **Vulva** tvoří přechod vaginální a kožní flóry
- U muže je specifický **předkožkový vak**, vedle kožní flóry jsou tu i např. nepatogenní mykobakteria apod.

Normální osídlení kůže

- Přestože kůže je pro mikroby nejdostupnější, je její **osídlení mnohem chudší** než v případě např. úst, pochvy či tlustého střeva
- Mikrob, který chce žít na kůži, musí snášet **vyschnutí a vysoké koncentrace solí**
- **Na kůži se tedy normálně vyskytují**
 - koaguláza negativní druhy stafylokoků
 - zlatý stafylokok – malé množství je normální
 - korynebakteria a příbuzné G+ tyčinky
 - malá množství kvasinek

Péče o střevní mikroflóru

- V **rekonvalescenci průjmů**, ale i např. **po celkové antimikrobiální terapii** (kde mohlo dojít k vybití části mikroflóry) je vhodné snažit se o **obnovu normálního stavu**
- Používají se **jogurty** (nesladké, netučné), **kyselé zelí**, různé preparáty (Hylac)
 - Některé obsahují substráty pro „dobré“ bakterie, to jsou **prebiotika**.
 - Některé obsahují přímo ty dobré bakterie, to jsou **probiotika**
 - Některé obsahují oboje, to jsou **symbiotika**

Péče o vaginální mikroflóru

- Také **vaginální ekosystém může být narušen** antimikrobiální léčbou či nějakým onemocněním
- Také zde doporučují „lidové receptury“ např. aplikaci jogurtu do pochvy
- Jinak lze doporučit **prebiotické či probiotické vaginální čípky**
- Důležitá je také **výživa a úprava hormonálních hladin** (antikoncepce)

Biofilm

Co je to biofilm

- Biofilm je **jeden ze způsobů života bakterií**. Je to způsob, kdy bakterie tvoří souvislou vrstvičku na určitém povrchu
- Opakem biofilmu je **planktonická forma života bakterie**
- Biofilm se v přírodě **vyskytuje velice často**. Biofilm je to, na čem v létě uklouzneme v rybníce, když šlápneme na kámen
- Biofilm může být **jednodruhový**, častěji však bývá **vícedruhový**
- Mohou se na něm podílet **bakterie, kvasinky, řasy a různé jiné mikroorganismy**

Biofilm: dobrý, nebo zlý?

- **Běžná mikroflóra se vyskytuje zpravidla více či méně ve formě biofilmu.** Takový biofilm je pro hostitele pozitivní a poskytuje mu ochranu před patogeny.
- Problém však je, pokud se ve formě biofilmu vyskytnou **patogenní mikroorganismy** a pokud dojde k narušení rovnováhy mezi mikroby a hostitelem.
- Závažný a nebezpečný bývá zejména **biofilm vzniklý na umělých površích** v organismu (katetry, implantáty a podobně)





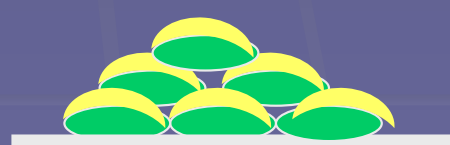
Píseň běžné flóry

My jsme skvělá flóra běžná
k našemu člověku něžná
osídlíme povrchy
číháme tu na mrchy

Scházíme se každý pátek
za účelem tvorby látek
z kterých vzniká biofilm
pevnější než dub i jilm!

(Píseň běžné flóry, in: O. Zahradníček – Advent v dutině ústní. Zkráceno)

Vznik biofilmu

- Na začátku je pevný povrch a plovoucí bakterie + 
- Bakterie adhezuje na povrch 
- Následuje agregace dalších bakterií 
- Bakterie začnou produkovat polysacharidovou matrix 
- Až vznikne třídímenzionální struktura zvaná biofilm 

Význam tvorby biofilmu u bakterií

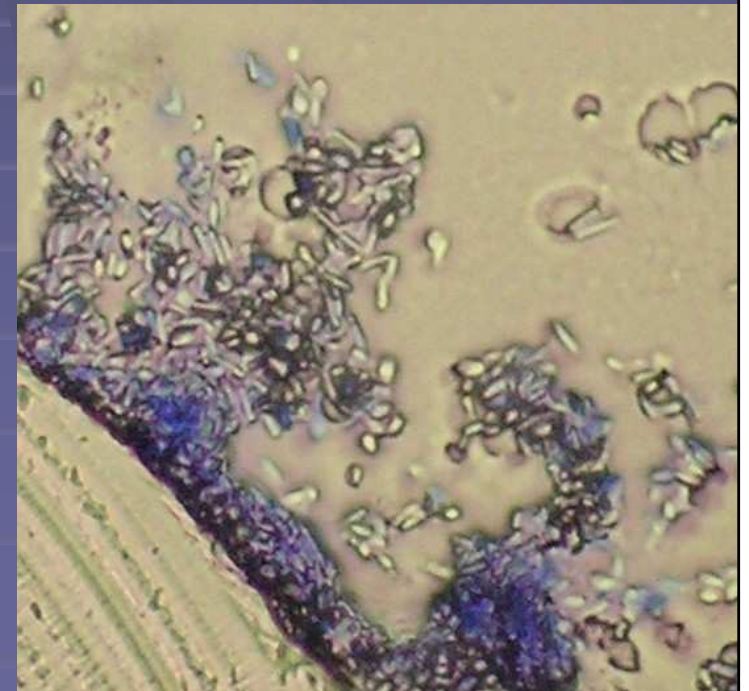
Bakterie mohou **lépe regulovat početnost populace**

– v rámci biofilmu se totiž informují produkcí určitých látek (tzv. quorum sensing)

Bakterie se stávají **odolnější vůči vnějším vlivům:**

- desinfekčním prostředkům
- antibiotikům
- imunitní reakci hostitele

Biofilm tvoří jak bakterie běžné flóry (z hlediska organismu spíše pozitivní), tak i patogeny.



Patologický biofilm – příběh

- Muž, 58 let, v roce 2001 zaveden kardiostimulátor, v roce 2002 opakovaně hospitalizován na interním oddělení s teplotami nejasné etiologie, vzestup zánětlivých markerů
- V hemokulturách prokázán *S. epidermidis* s velmi dobrou citlivostí
- Několikrát dlouhodobě přeléčován vysokými dávkami antibiotik v kombinacích (oxacilin, gentamicin, rifampicin, cefazolin, cefalotin, klindamycin)

Příběh – pokračování

- Zpočátku vždy dobrá odezva, poté se objevují ataky teplot i v průběhu terapie.
- Při vyšetření přes jícen nález vegetace na komorové elektrodě o velikosti 1,5 × 1,5 cm.
- Kardiologové opakovaně odmítají odstranění kardiostimulátoru. Nasazena kombinace antibiotik oxacilin + gentamicin + rifampicin, pacient v dobrém klinickém stavu.
- Znovu však dochází k vzestupu teplot a zvýšení CRP. Nasazena terapie vankomycin + rifampicin, po zlepšení stavu je pacientovi odstraněn trombus a vyměněna elektroda (pod clonou ATB), to vede k celkovému zlepšení stavu pacienta.

Viníkem byl biofilm

- Neúspěch zvolené ATB terapie byl zapříčiněn tím, že **nebyla brána v úvahu vysoká rezistence mikroba rostoucího ve formě biofilmu vůči těmto antibiotikům.**
- Léčba nebyla od samého začátku dostatečně razantní a nedošlo k eradikaci ložiska biofilmu.
- Teprve **odstranění elektrody (pod clonou ATB)** došlo ke **zlepšení stavu pacienta.**

Mechanismy ovlivňující rezistenci k antibiotikům

- Vliv **povrchového náboje**
- Snížení **růstové rychlosti**
- **Horší prostupnost antibiotika**
- Nehomogenní matrix
- **Fenotypové odlišnosti**
- **Intercelulární signalizace**
- **Imunitní mechanismy...**

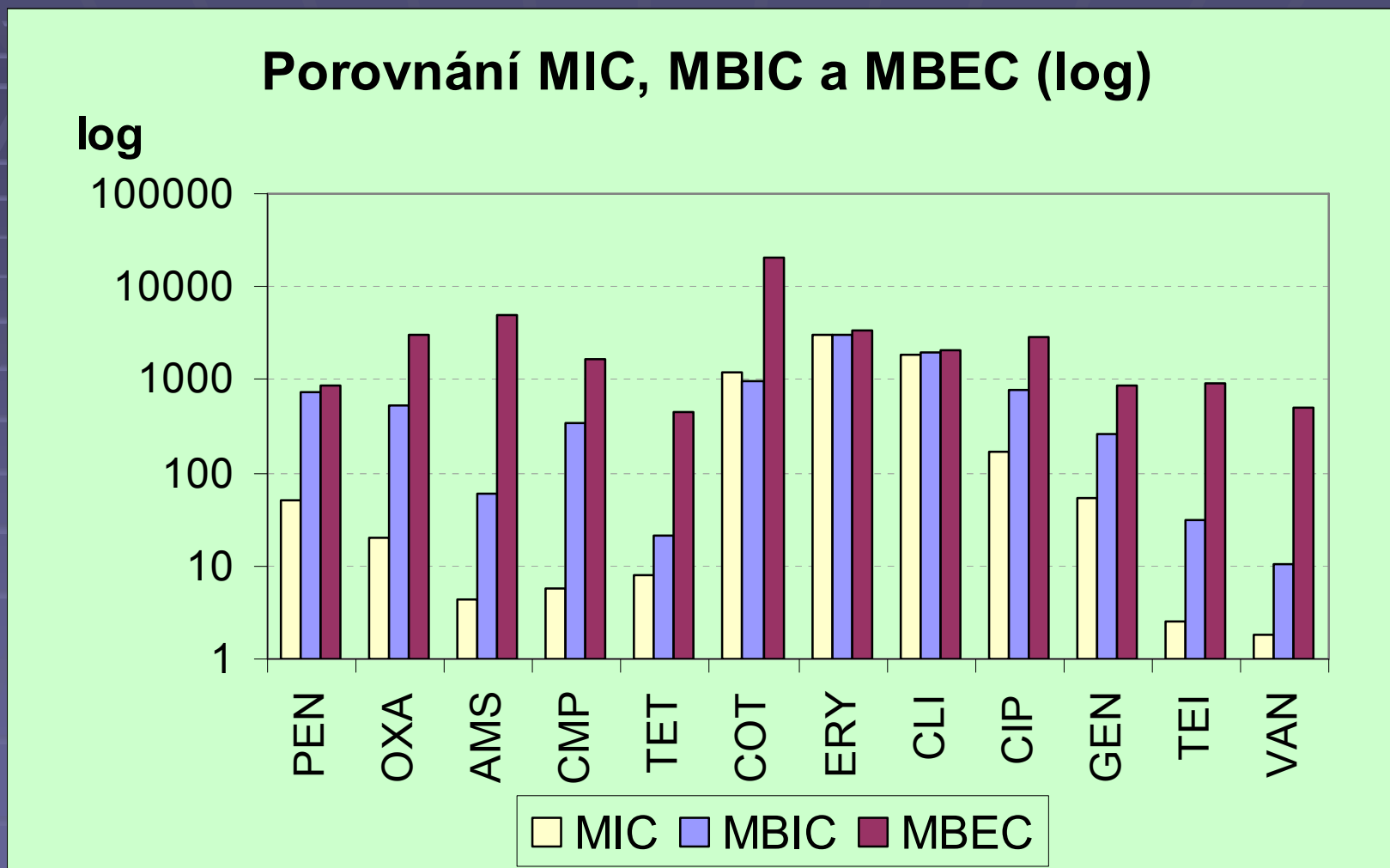
Biofilm a antibiotika

- Pokud jsou bakterie ve formě biofilmu, **nemusí antibiotika „zabrat“**, i když klasické metody in vitro citlivosti dávají léčbě šanci.
- V takovýchto případech **není vypovídající hodnota MIC či MBC**, ale **hodnoty MBIC** (minimální biofilm inhibující koncentrace) **a MBEC** (minimální biofilm eradikující koncentrace)

Biofilm a antibiotika – pokračování

- Hodnoty MBIC a MBEC leží často **nad break pointem** pro daná antibiotika (bakterie jsou k nim tedy rezistentní).
- Někdy jsou **několikanásobně vyšší** než MIC, takže určení MIC je málo vypovídající
- Mikroby v biofilmu jsou zpravidla rezistentní i ke **kombinacím antibiotik**, jedinou možností potom zůstává vyjmutí biofilmového ložiska (katétru, kloubních náhrad, zubních implantátů apod.)

Rozdíly v MIC, MBIC a MBEC – porovnání



Zkratky antibiotik: pen – penicilin, oxa – oxacilin, ams – ampicilin/sulbactam, cmp - chloramfenikol, te t – tetracyklin, cot – kotrimoxazol, ery – erytromycin, cli – clindamycin, cip – ciprofloxacin, gen – gentamicin, tei – teikoplanin, van – vankomycin

Biofilm a mikrobiologická diagnostika

- Protože dnes víme, že biofilm existuje a je důležitý, nemůžeme se tvářit, že tomu tak není.

Biofilm ovlivňuje mikrobiologickou diagnostiku v následujících bodech:

- Pokud předpokládáme tvorbu biofilmu, je třeba to zohlednit při **zpracování materiálu** (např. u katetrů)
- Je možné přímo **detekovat tvorbu biofilmu**, resp. sklon bakterií tvořit biofilm
- Je možné (a užitečné) **určovat hodnoty MBIC a MBEC.**

Kultivace bakterií tvořících biofilm

- **Pokud bakterie tvoří biofilm, je vhodné zohlednit tuto skutečnost při zpracování materiálu**
- V poslední době se vedou velké diskuse např. o tom, jak zpracovávat **žilní katetry** před jejich kultivací v mikrobiologické laboratoři.
- Jsou vyvíjeny metody, jejichž cílem je dobrý záchyt patogenů, jejich kvantifikace a zároveň odclonění kontaminace

Klasické zpracování katetrů

- **Klasická kultivace v bujonu:** katetr se vloží do tekuté půdy a kultivuje 24 h. Je-li po této době bujon zakalený, je vyočkován na pevnou půdu a případné bakterie identifikovány.
- **Co se stane:** Uvolní se bakterie v planktonické formě. Bakterie ve formě biofilmu se uvolní málo nebo vůbec.
- Vzhledem k použití bujónu jako pomnožovací půdy **nevíme nic o kvantitě** (kontaminace × infekce).

Nové možnosti zpracování katetrů

- **Semikvantitativní metoda:** Bujon se oválí po povrchu pevné půdy. **Co se stane:** zmapujeme povrch katétru a semikvantitativně posoudit nález, nevypovídá však o bakteriích uvnitř a bakterie se nemusí uvolnit z biofilmu.
- **Sonifikace:** biofilm rozbijeme ultrazvukem. **Co se stane:** rozrušíme biofilm na povrchu i uvnitř katétru. Vyočkování určitého objemu vzorku je kvantitativní metoda, takže dává možnost posoudit množství mikrobů.

Možnosti detekce produkce biofilmu u bakterií a kvasinek

- Průkaz biofilmu fenotypovými metodami (kultivace na agaru s kongo červení, Christensenova metoda)

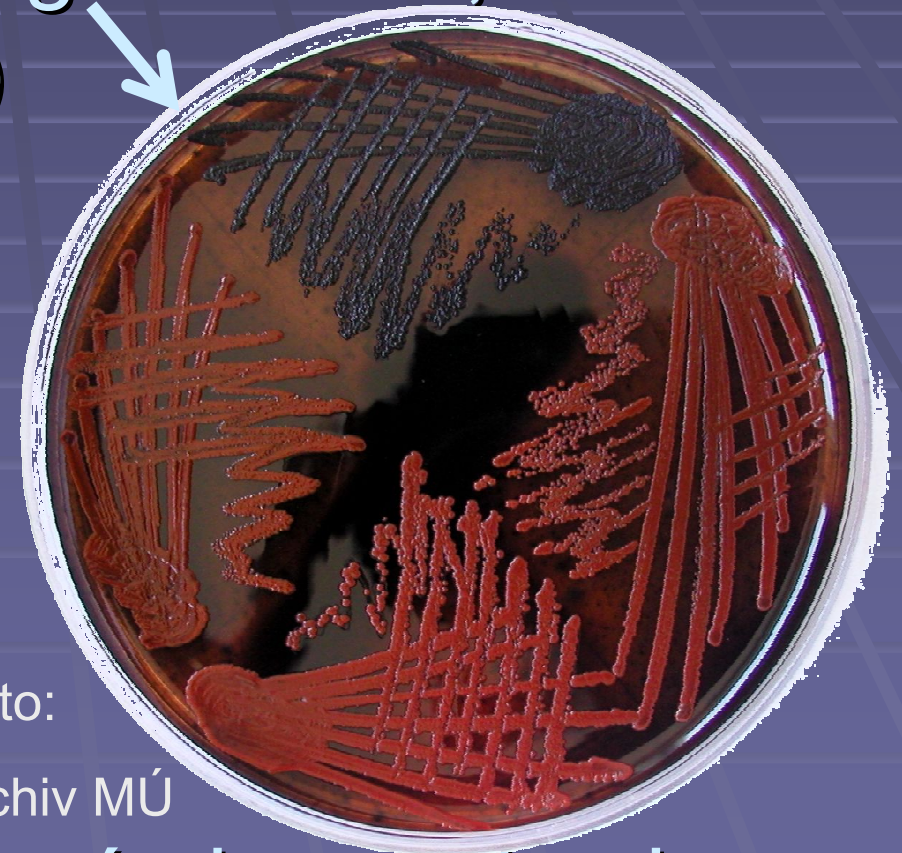
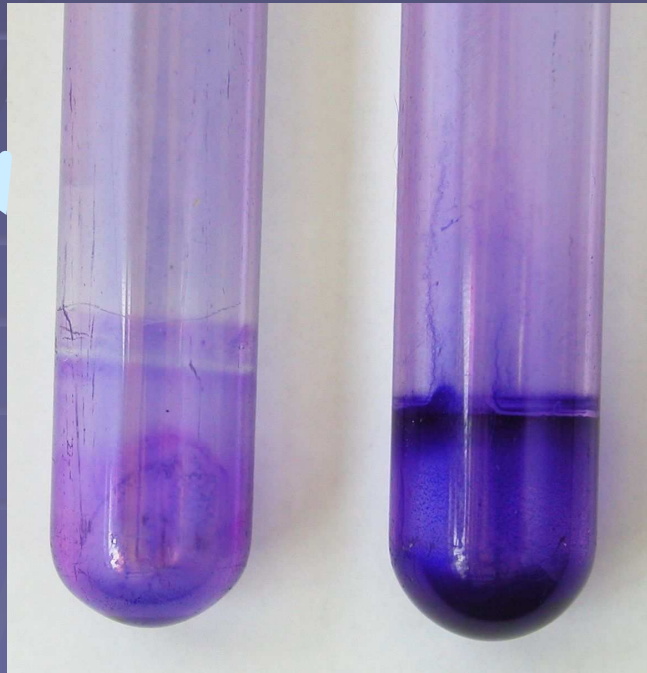


Foto:
archiv MÚ

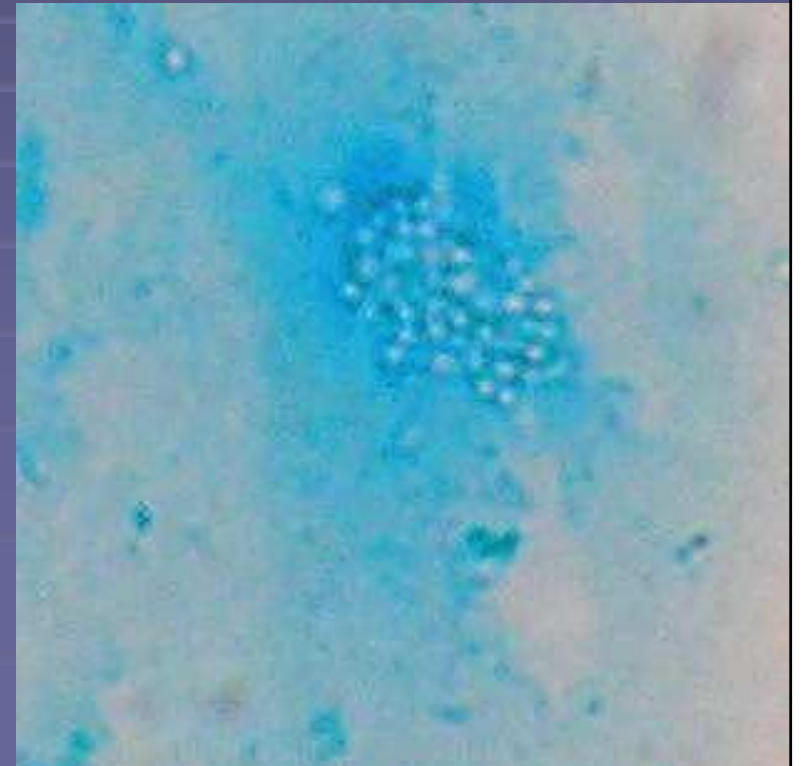
- Průkaz biofilmu genotypovými metodami

Spíše pro výzkumné a výukové účely: Mikroskopie orálního biofilmu

- V preparátech barvených Gramem lze pozorovat shluky bakterií (G+ i G-) a případně buňky makroorganismu (epitelie apod.)
- Jiná barvení, např. barvení alciánovou modří umožňují i znázornění polysacharidového materiálu, tj. nebuněčné části biofilmu, buňky jsou zde znázorněny negativním barvením

Foto:

archiv MÚ



Jak zjistit biofilm na zubní sklovině

- Dobrovolník má připravenou tabletku s barvivem barvicím zubní plak.



- Tabletka se nechá působit v dutině ústní cca 2 min. Poté je vidět, kde se nejvíce usazuje plak

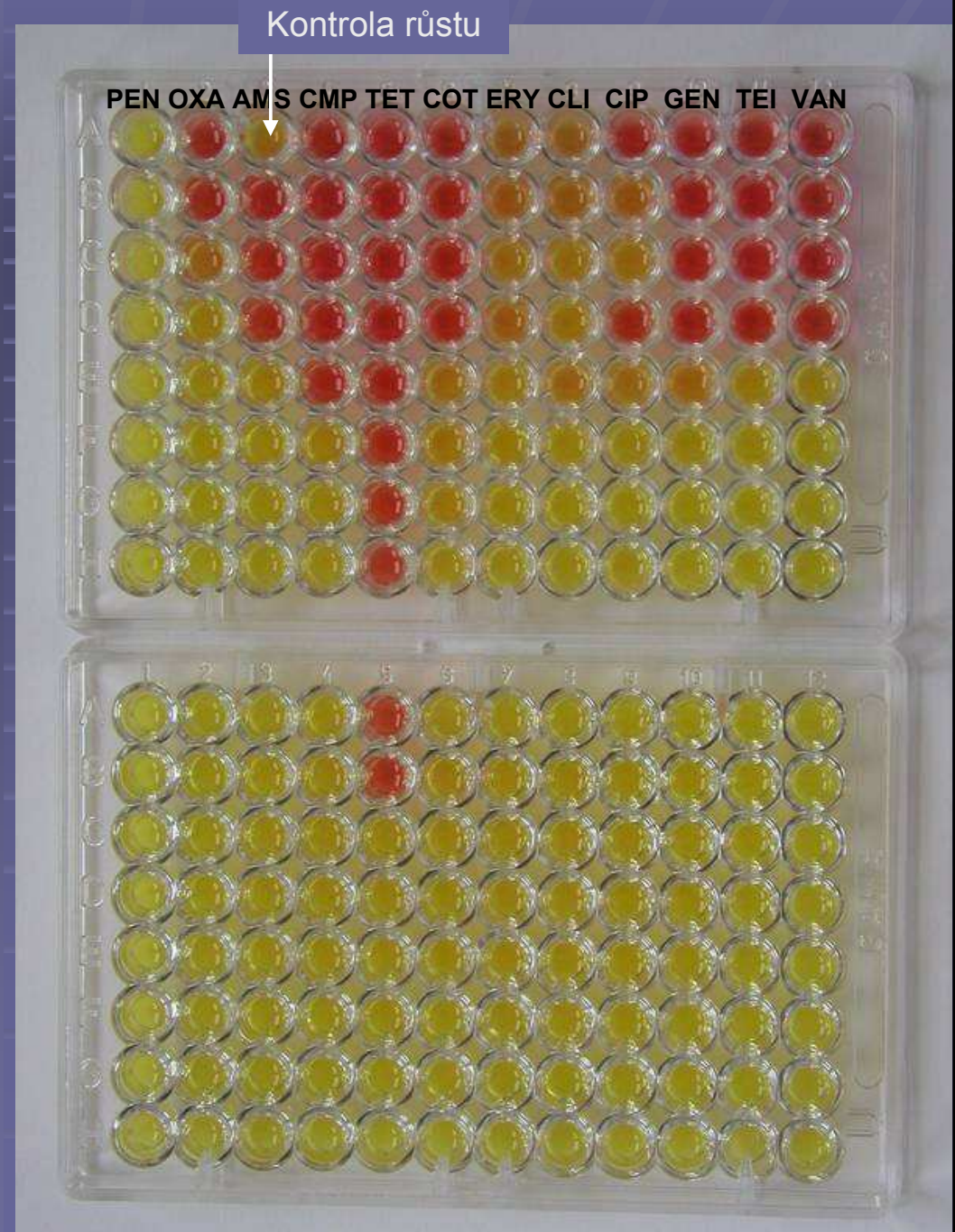


Foto:

archiv MÚ

Stanovení MBIC a MBEC

- Používá se podobných destiček jako při určování MIC, avšak speciální metodika umožní určení hodnoty MBIC či MBEC.



Léčba: Eradikace biofilmu

- **Antibiotická léčba často potlačí pouze symptomy** infekce způsobené buňkami uvolněnými z matrix biofilmu a jejich interakcí s imunitním systémem, buňky uložené v matrix biofilmu není schopna zasáhnout.
- K **eradikaci biofilmu** je možno využít vysokých koncentrací ATB či jejich kombinací (např. ATB zátka katétru), **pokud léčba selhává, je nutno vyjmout ložisko biofilmu**

Prevence

- Prevence nadměrného **biofilmu v ústní dutině**
 - Pravidelné čištění zubů a omezení sladkých jídel a nápojů
- Prevence **katetrových biofilmů**
 - Katétry a kostní cementy z materiálů nepodporujících tvorbu biofilmu, případně s **antimikrobiálními substancemi**, např. minocyklin či rifampicin
 - **Proplachy katétrů**
 - **Dodržování pravidel asepse**, správné dekontaminační postupy apod.

Nashledanou příště!



Červený jazyk jedné studentky v praktiku věnovaném průkazu ústního biofilmu

Foto O. Z.