

Biofilm a jeho význam

Filip Růžička

Mikrobiologický ústav LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Přednáška pro II. r. VL 2015

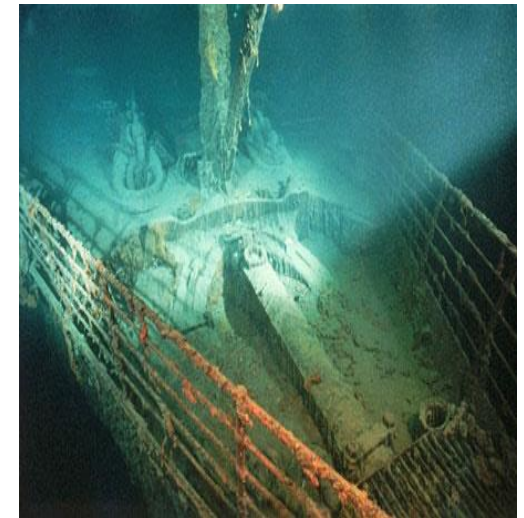


Orlice



HISTORIE

- **1676 Antony van Leeuwenhoek**
sledoval bakterie v zubním povlaku
- **Od dob Pasteura a Kocha 100 let**
nikoho nenapadlo, že mikrobi v přírodě rostou jinak, než jako volně se vznášející plankton v tekutinách nebo jako kolonie na pevných půdách
- **1935 C. E. Zobel**
první popis biofilmu u mořských bakterií
- **1950 – 1960**
první zprávy o problémech s biofilmem
- **1978 J. W. Costerton**
upozornění na všudypřítomnost biofilmu a jeho možná účast na perzistentních infekcích



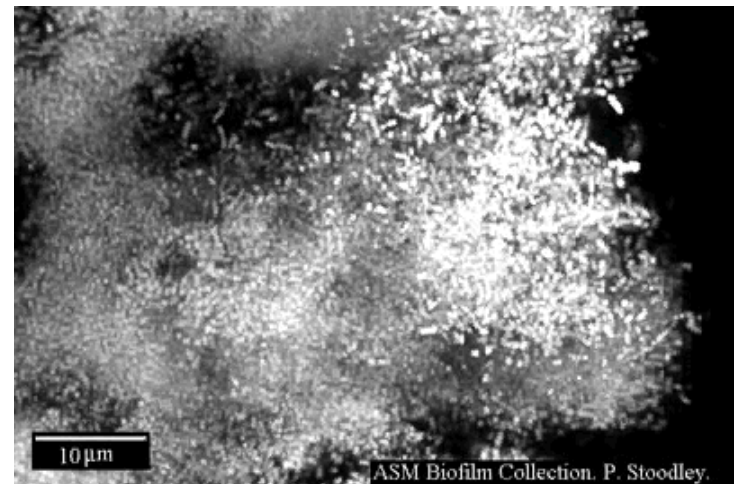
BIOFILM

Mikrobiální biofilm je společenství mikroorganismů, které se tvoří na rozhraní fází.

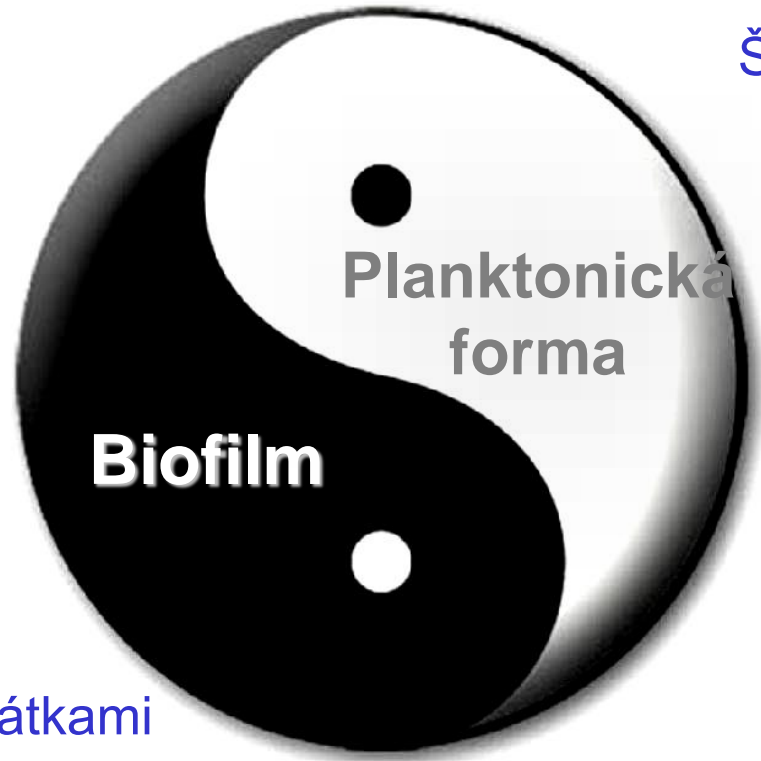
Pevně **lne** k inertním i živým povrchům.

Vedle mikrobiálních buněk bývá důležitou stavební složkou biofilmu i **mezibuněčná hmota**.

V biofilmu probíhá **komunikace a kooperace** mezi jednotlivými buňkami i celými populacemi



Biofilm – adheze, kooperace, gradient



Šíření mikroorganismů
Způsob života mimo
rozhraní fází

Mechanická ochrana
Vliv na účinek ATB
Ochrana před chem. látkami
Výměna genetické informace
Homeostáza - mikroprostředí
Kooperace a specializace buněk
Ochrana před imunitním systémem

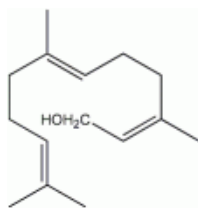
Regulace tvorby biofilmu

hustota populace, složení společenstva, koncentraci živin aj.

System quorum-sensing – malé extracelulární **signální molekuly**
→ akumulace → transkripce cílových genů.

Jeden druh může mít více QS systémů a více signálních molekul

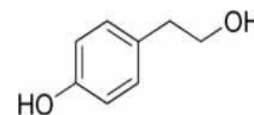
Kandidy -



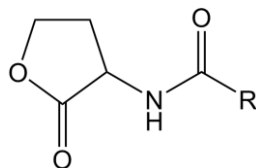
FARNESOL – vliv na expresi min. 274 genů
inhibice biofilmu

X

tvorba klíčků, časná fáze tvorby biofilmu - **TYROSOL**



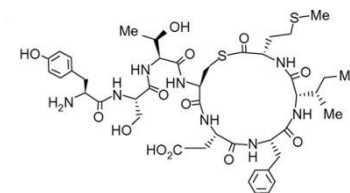
G- bakterie -



N-acyl-L-homoserin laktony

G+ bakterie - signální peptidy

(s cyklickou thionolaktonovou strukturou)



Biofilm – významný faktor virulence

- mechanická ochrana buněk (adheze k povrchům a matrix)
- Vrstva biofilmu tvoří vhodné mikroprostředí v okolí mikrobů
- Kooperace a specializace buněk, přenos genů
- Ochrana před účinky imunitního systému
- Vliv na účinek antimikrobiálních látek
 - Snížená **difúze** do biofilmové vrstvy, **vazba** na struktury biofilmu,
 - Zvýšená **degradace** ATB účinkem enzymů
 - Změny vlastností mikroba, **exprese odlišných genů**
(*multidrug efflux pumps* CDR, MDR)
 - **Heterogenita** populace (genetická variabilita), **perzistoři**
 - Změny **mikroprostředí**
 - Změny **rychlosti růstu**

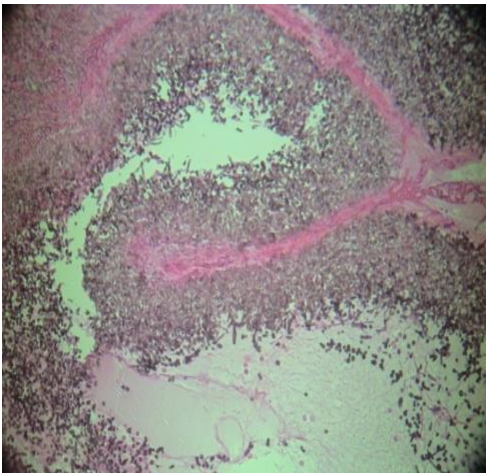
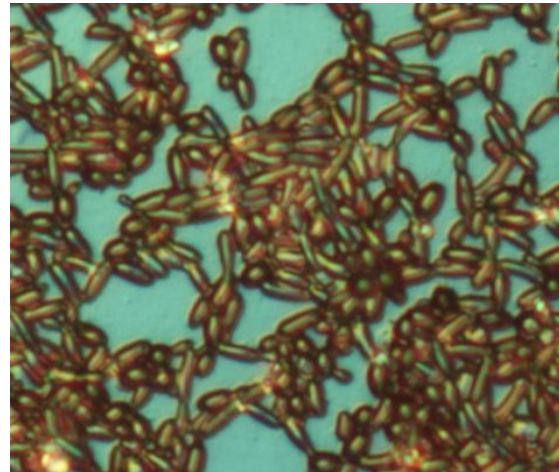
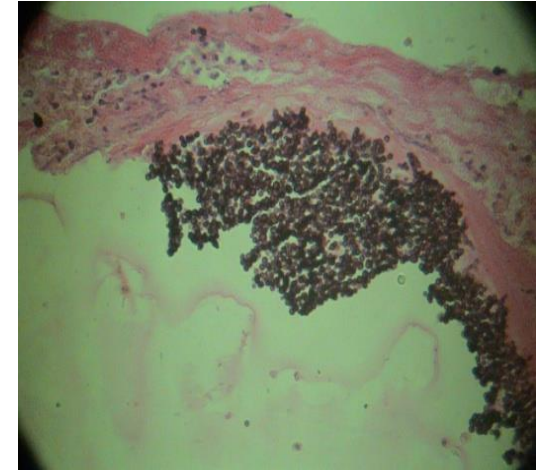
BIOFILMOVÁ ONEMOCNĚNÍ

- pomalý, chronický průběh
- často bez výraznějších příznaků
- občas akutně exacerbuje
- antibiotická terapie mívá omezený efekt
- po vysazení antibiotik infekce rekurují

izolovaná agens se mohou jevit dle MIC jako citlivá

Biofilmové infekce spojené s přítomností implantátů

biofilmové infekce krevního řečiště (katérové sepsy, infekce chlopenních náhrad, aj.),
endotracheální kanyly, chirurgické stehy,
infekce močových katetrů,
inf. kloubních náhrad,
kontaktní čočky
aj...



aj...
kolpitydy,
zubní kaz, rány
otitis, osteomyelitidy,
pneumonie u cystické fibrózy
subakutní endokarditidy, cholecystitidy

Biofilmové infekce nativních povrchů

BIOFILM V MAKROORGANISMU HRAJE I PROSPĚŠNOU ROLI

normální mikroflóra tvoří vrstvu biofilmu na
sliznicích

Problémy s biofilmem jsou i mimo medicínu

- Znečištění povrchů
 - Zvýšení turbulence protékající tekutiny
 - Zúžení průsvitu až ucpání potrubí
 - Koroze ropovodů, nádrží paliva v letadlech
 - Černání tekutin redukovanými kovy
 - Tvorba izolační vrstvy v tepelných výměnících
 - Zvýšení odporu lodního trupu při plavbě
- aj.



Jak **diagnostikovat** infekce s
přítomností biofilmu?

Jak **interpretovat** schopnost agens
tvořit biofilm?

Jak **léčit** infekce spojené s přítomností
biofilmu?

Laboratorní diagnostika biofilmových infekcí

Pevné přilnutí k povrchu - ↓ záchytu mikroba.

Je přítomen biofilm? Jakou hraje roli v patogenezi?

Jak ovlivní biofilm terapii?

Průkaz infekce implantátu



A) Nevyžadující vyjmutí implantátu

B) Průkaz kolonizace implantátu po jeho vyjmutí

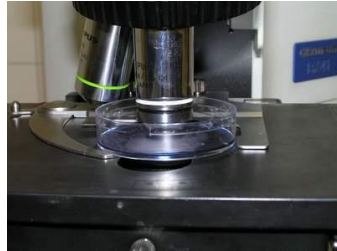
Průkaz schopnosti tvořit biofilm



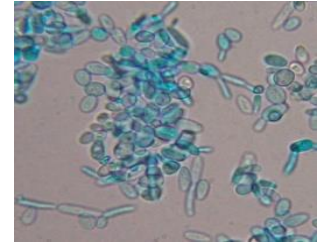
Účinnost antimikrobiální terapie na biofilm

Fenotypové metody průkazu tvorby biofilmu

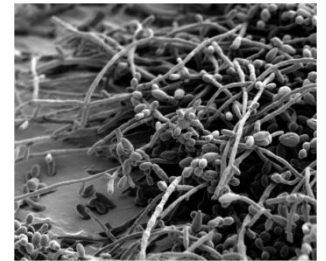
Vizualizace



Adheze

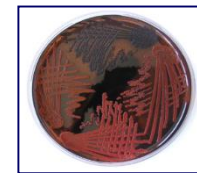


Biofilmová
vrstva

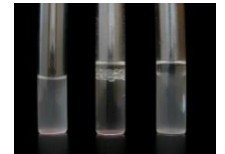
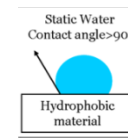
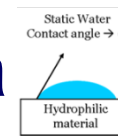


Kultivační průkaz

Průkaz klíčových složek biofilmu



Povrchové vlastnosti mikroba

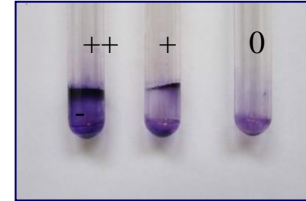


Průkaz genů zodpovědných za biofilm

Kultivační průkaz tvorby biofilmu

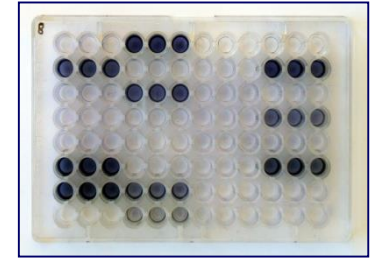
Modifikace Christensenovy metody (Christensen et al., 1982,1985)

1) Kultivace mikroba v přítomnosti vhodného kultivačního povrchu



Zkumavková metoda

Mikrodestičková metoda



Disková metoda



2) Promytí - odstranění planktonických buněk

3) Průkaz vytvořené

biofilmové vrstvy

→ **Zjištění počtu CFU**

→ **Barvení + spektrofotometrické měření**

→ **Sušina**

→ **Kolorimetrická média** (redukce tetrazoliových solí, resazurin aj.)

→ **a další**

Klinický význam průkazu tvorby biofilmu

Marker klinické významnosti kmene

Je kmen izolovaný z hemokultur klinicky relevantní?

Nejde o kontaminaci?

Průkaz tvorby biofilmu může přinést cenné klinické informace

Prognóza. Jak postupovat v další léčbě?

Citlivost biofilmu k antimikrobiálním látkám

Jaké antimikrobiální látky použít na katérovou infekci?

MIKROBY V BIOFILMU JSOU VŽDY ODOLNĚJŠÍ NEŽ FORMY PLANKTONICKÉ

MIC neodpovídá koncentracím antimikrobiálních látek schopných zasáhnout biofilm (**MBIC a MBEC**)

Zvýšená odolnost se týká **dezinfekčních látek i antibiotik/antimykotik**

Rozdíly v citlivost činí až **několik řádů**

Předpokládá se **více mechanismů**, které se na rezistenci BF podílí

MIC nemá přímý vztah k **MBIC a MBEC**

MBIC - minimální biofilm inhibující koncentrace

MBEC - minimální biofilm eradikující koncentrace

ZHORŠENÝ PRŮNIK

EXTRACELULÁRNÍ MATRIX - PENETRAČNÍ BARIÉRA

SNÍŽENÍ DIFÚZE ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

nelze však vždy prokázat

VLIV POVRCHOVÉHO NÁBOJE

zdá se důležitější např. aminoglykosidy (+)
se vážou na alginát (-) *P. aeruginosa*

SNÍŽENÁ DIFÚZE ENZYMŮ jako jsou β -laktamázy

Snazší degradace antibiotik

ZMĚNA PROSTŘEDÍ

- **vyčerpání O₂ v určitých oblastech**
- **zvýšení osmotického tlaku**
- **nahromadění kyselých zplodin metabolismu**

přímý účinek - potlačení účinku antibiotika
chinolony, aminoglykosidy

nepřímý účinek - snížení růstové rychlosti
beta-laktamy, glykopeptidy

ZMĚNA MIKROBIÁLNÍ POPULACE

toxická látka



zabije většinu mikrobů v biofilmu



zůstane subpopulace buněk

k dané látce vysoce rezistentních

„Biofilmový fenotyp“ - exprese genů
zodpovědných za rezistenci

tato subpopulace odpovídá za zvýšenou rezistenci biofilmu

**PREVENCE BIOFILMOVÝCH INFEKČÍ
JE VÝHODNĚJŠÍ NEŽ LÉČBA**

Společný zájem pacienta, lékaře i ekonomů

Agens a jeho faktory virulence (adheze aj.)

Stav pacienta (imunoprese, věk, další onemocnění)

Typ implantátu (mechanické, konstrukční a fyzikálně-chem. vlastnosti, zvl. charakter povrchu aj.)

Způsob zavedení a péče o implantát

Implant. infekce

Prevence biofilmových infekcí

Vhodná volba implantátu a způsob zavedení (asepticky!)

Zkušený personál + kvalitní následná péče

Preventivní/preemptivní podání ATB u rizikových pacientů ???

Vhodný materiál (charakter povrchu: druh materiálu, povrchová energie, povrchový náboj, hrubost aj.)

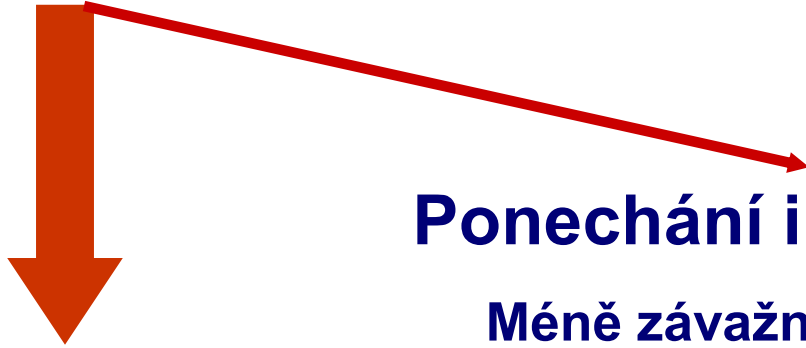
Impregnace implantátů - antimikrobiální látky a antiseptika (chlorhexidin, Ag)

Biofilmová infekce

Terapie infekcí spojených s tvorbou biofilmu



Terapie infekcí spojených s tvorbou biofilmu



Likvidace ložiska

odstranění
implantátu

+

následná
ATM terapie

Ponechání infikovaného implantátu

Méně závažné infekce

↓ patogenními mikroby (např. CoNS),
↓ riziko diseminace

Stabilizovaný pacient, benigní průběh,
bez komplikací

Reaguje na ATB terapii

Pokus o likvidaci ložiska biofilmu (Vysoká pravděpodobnost selhání)

Budoucnost

Prevence katérových infekcí

Interference se signály typu *quorum sensing* (furanony, RNAIII-IP, AIP)

Ovlivnění povrchových vlastností katétru

Inhibice vzniku vysoce odolných perzistorů

Vakcinace

?

Terapie katérových infekcí

Rozvolnění mezibuněčné hmoty

enzymaticky (lyasy polysacharidů)

fyzikálně (ultrazvukem, elektromagnetickým polem)

Molekuly vyvolávající autodestrukci biofilmu

regulátory tvorby biofilmu (*quorum sensing* - furanony, RNAIII-IP, AIP)

?

Děkuji za pozornost

