

# Biofilm a jeho význam

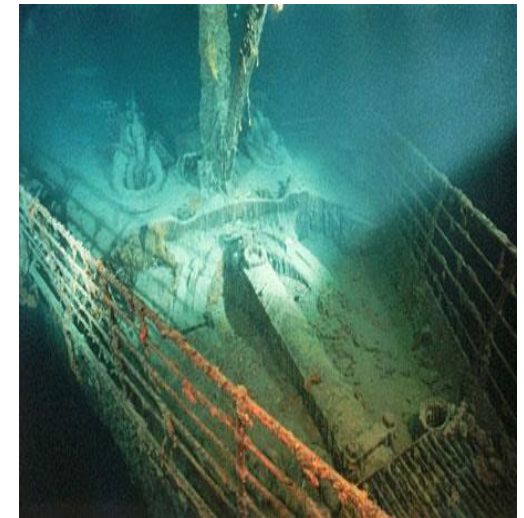
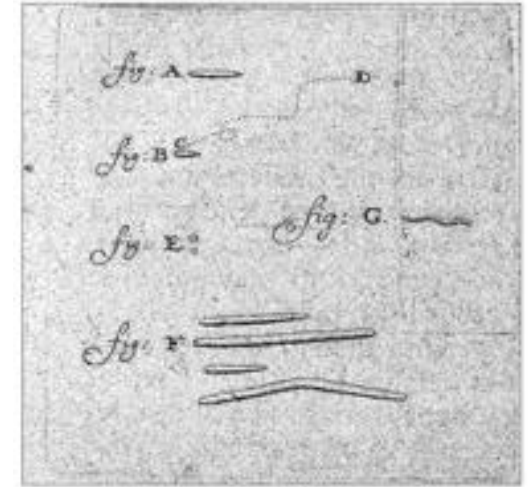
Filip Růžička

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

Přednáška pro ZL 2021

# 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



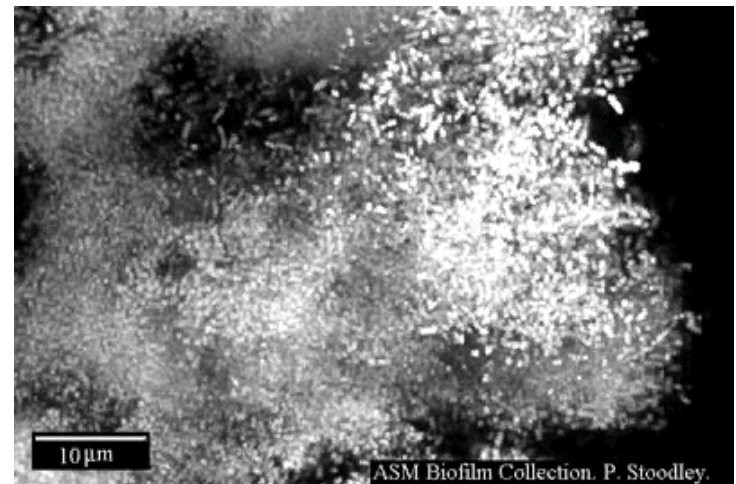
# BIOFILM

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

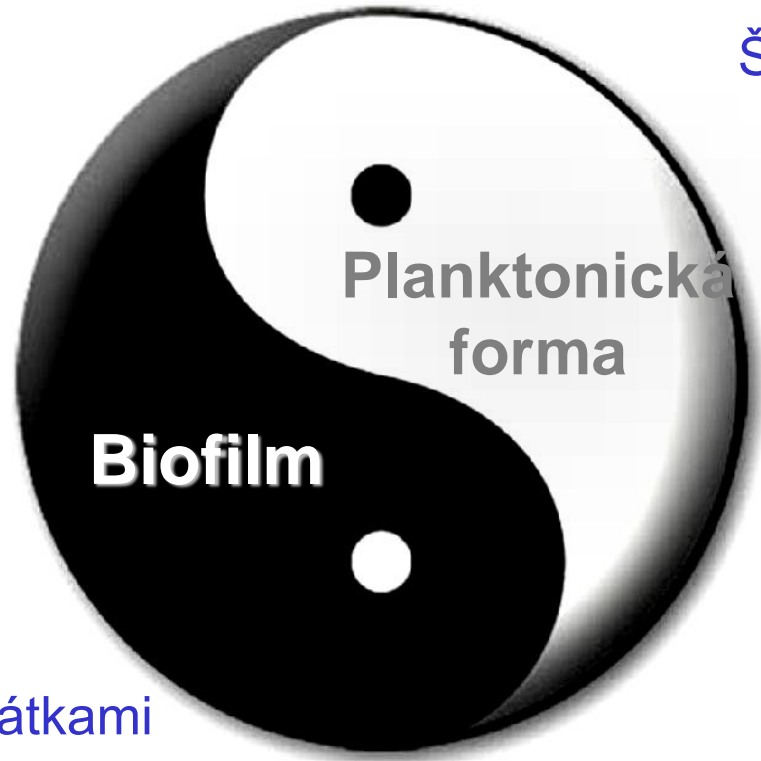
Pevně **lne** k inertním i živým povrchům.

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

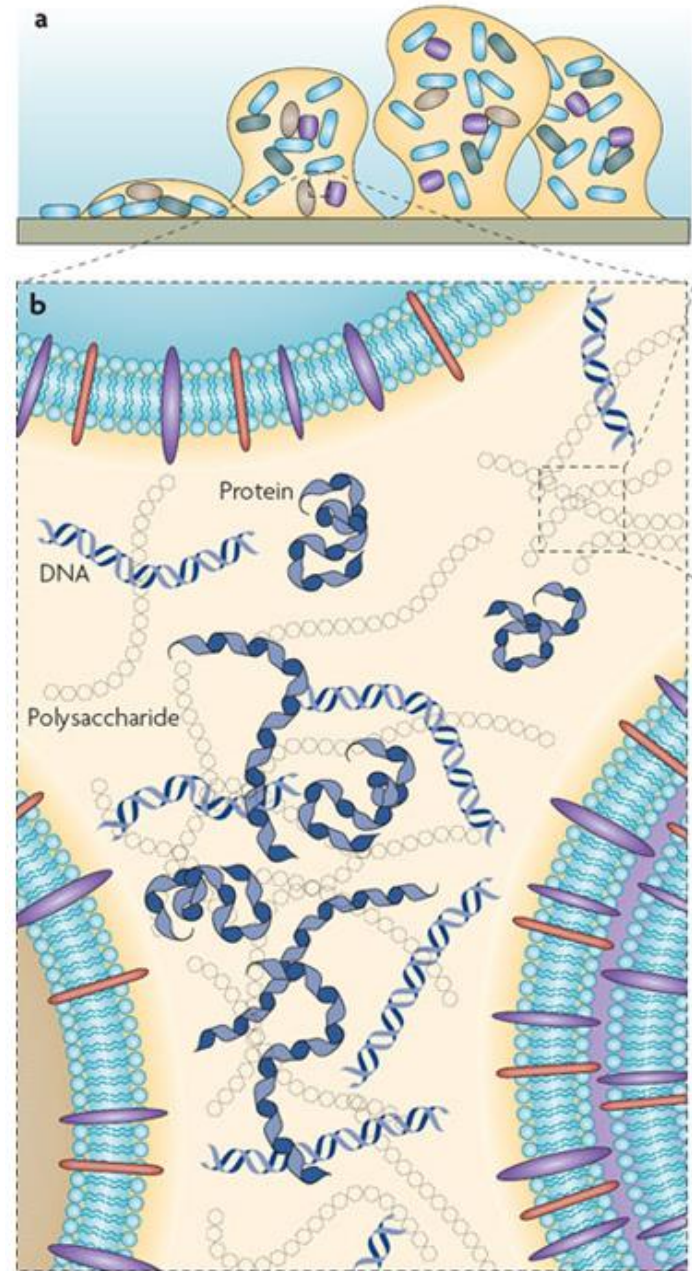
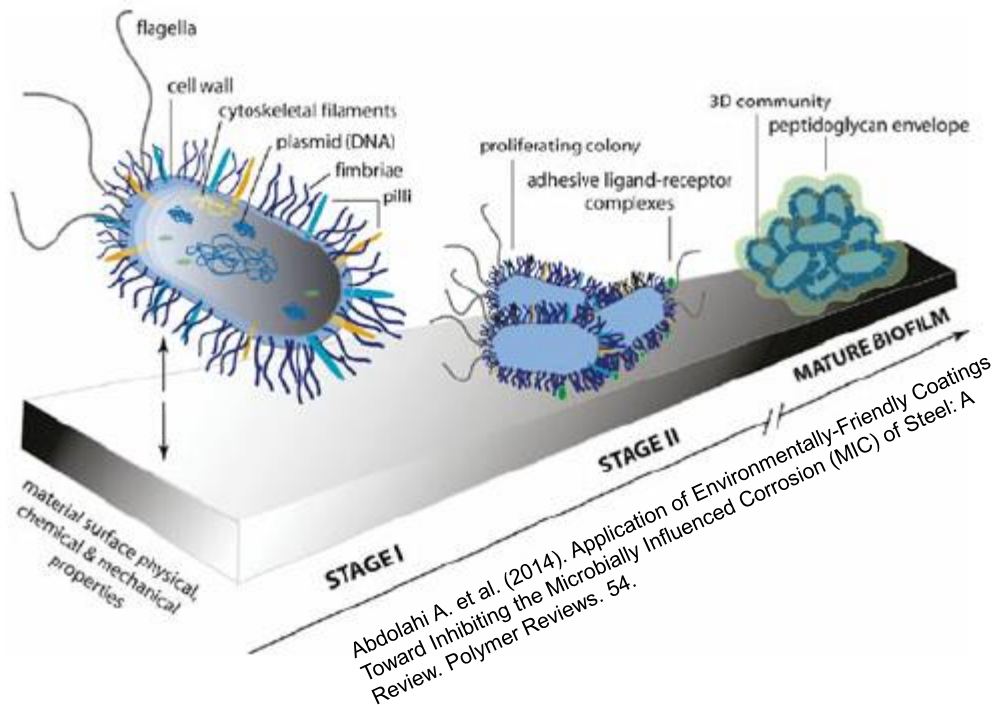
Kooperace a specializace buněk

Ochrana před imunitním systémem

# BIOFILM

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

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



Flemming HC, Wingender J. (2010). The Biofilm Matrix. Nature reviews. Microbiology. 8. 623-33.

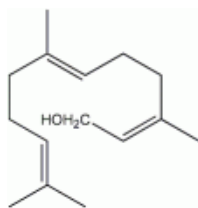
# Regulace tvorby biofilmu

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

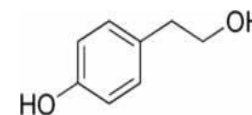
**Kandidy -**



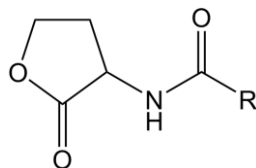
**FARNESOL** – vliv na expresi min. 274 genů  
inhibice biofilmu

**X**

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



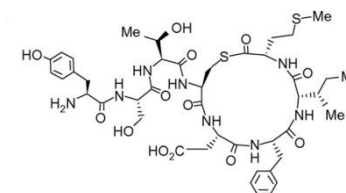
**G- bakterie -**



**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

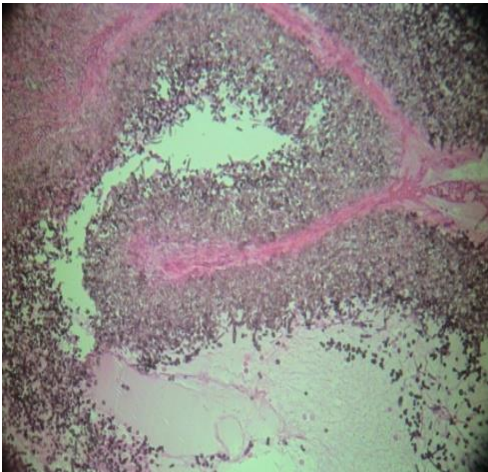
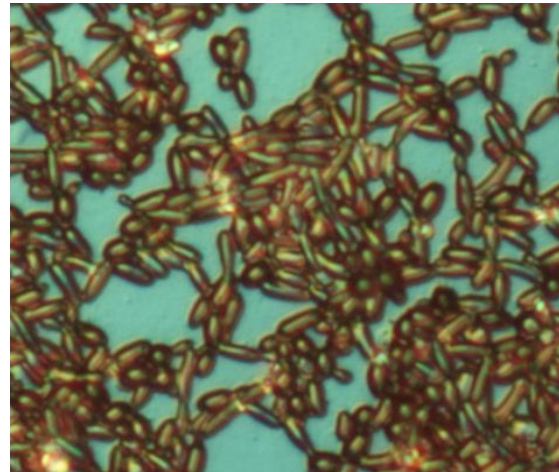
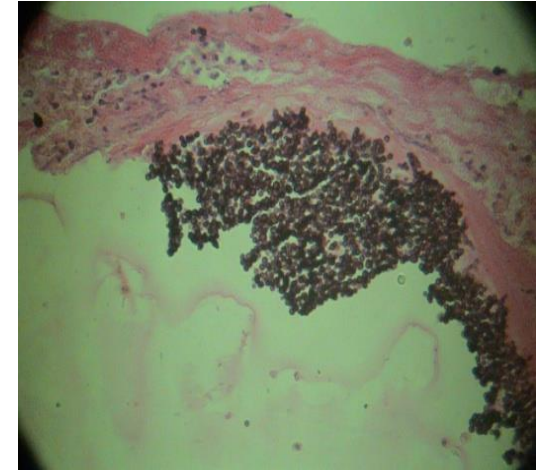
- pomalý, chronický průběh
- často bez výraznějších příznaků
- občas akutně exacerbují
- antibiotická terapie mívá omezený efekt
- po vysazení antibiotik infekce rekurují

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

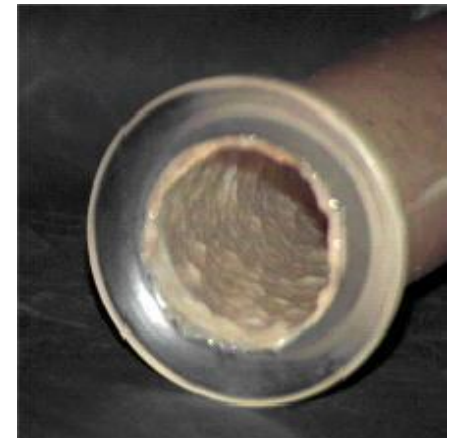
## Biofilmové infekce nativních povrchů

# **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 redukovánými 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

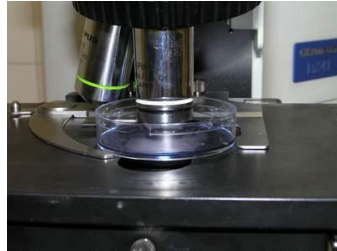
B) Průkaz kolonizace implantátu po jeho vyjmutí

↓  
Průkaz schopnosti tvořit biofilm

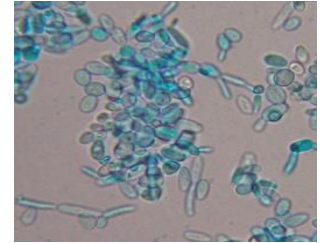
↓  
Účinnost antimikrobiální terapie na biofilm

# Fenotypové metody průkazu tvorby biofilmu

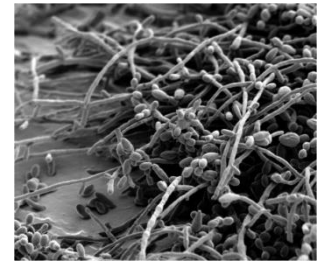
**Vizualizace**



Adheze

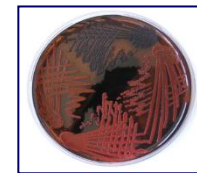


Biofilmová  
vrstva

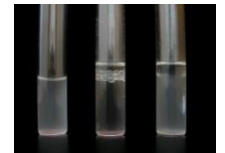
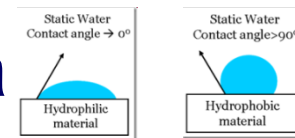


**Kultivační průkaz**

**Průkaz klíčových složek biofilmu**



**Povrchové vlastnosti mikroba**



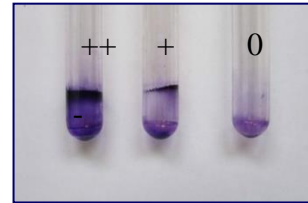
**Průkaz genů zodpovědných za biofilm**

# Kultivační průkaz tvorby biofilmu

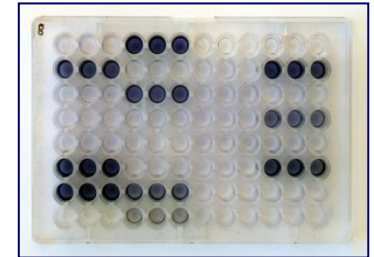
Modifikace Christensenovy metody (Christensen et al., 1982,1985)

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  $\beta$ -laktamázy

Snazší degradace antibiotik

# ZMĚNA PROSTŘEDÍ

- **vyčerpání O<sub>2</sub> 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**

# Prevence biofilmových infekcí

**Vhodná volba implantátu a způsob zavedení (asepticky!)**

**Zkušený personál + kvalitní následná péče**

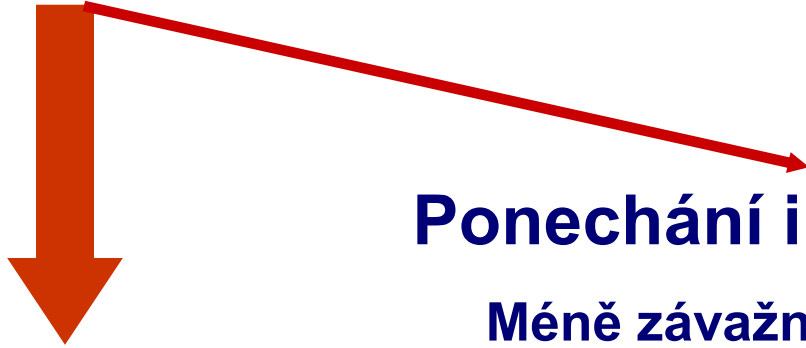
**Preventivní/preemptivní podání ATB u rizikových  
pacientů ???**

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

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



# 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)

?