

P 12 Bakteriální biofilm

K nastudování: Biofilm (z učebnic, www atd.)

Z jarního semestru: Mikroskopie, Kultivace, Biochemická identifikace, stanovení citlivosti k antibiotikům

Úkol 1: Mikroskopie orálního biofilmu

Sterilní špachtlí setřete si zubní plak. Natřete na podložní sklo, fixujte je a obarvete podle Grama. Druhý obrázek nakreslete podle prezentace. Jde o preparát obarvený alcianovou modří (barvivo selektivně se váží na polysacharidy). Fixovaný preparát byl polit alcianovou modří a barven asi 5 minut. Popište a zakreslete sledované útvary. Všimněte si shluků bakterií a v preparátu barveném alcianovou modří obarvené extracelulární polysacharidové substance (v preparátu barveném Gramem je nevidíte)

Gramovo barvení	Alcianová modř

Úkol 2: Vliv čištění zubů na orální biofilm

Vypláchněte si ústa roztokem předloženého barviva dle pokynů vyučujícího a prohlédněte. Zbarvená místa jsou pokryta biofilmem. Popište místa, kde se biofilm usazuje nejvíce, případně kde nebyl biofilm odstraněn při čištění zubů. Poté si zuby vyčistěte, máte-li čím.

Výsledek: Biofilm se nejvíce usadil na těchto místech: _____

Úkol 3: Průkaz mikrobů kolonizujících katétru

a) Kvalitativní metoda pomnožení v bujónu

Vytažený centrální venosní katétr (CVK) byl ponořen do kultivačního média a kultivován 24 hodin. Poté bylo zakalené kultivační médium vyočkováno na krevní agar. Zhodnoťte nárůst mikroorganismů na krevním agaru.

3 b) Semikvantitativní metoda (Makiho metoda)

Vytažený CVK byl válen po povrchu krevního agaru, který byl poté kultivován. Zhodnoťte nárůst mikroorganismů a spočítejte narostlé kolonie. Za signifikantní se považuje množství kolonií >15, menší množství je možno považovat za kontaminaci. Je-li kolonií evidentně více než 100, nepočítejte a napište „> 100“.

c) Kvantifikace pomocí sonifikace katétru

Vytažený CVK se ponoří do 10 ml fyziologického roztoku a poté vystaví účinku ultrazvuku, který rozrušuje strukturu biofilmu a jednotlivé bakteriální buňky tak z biofilmu uvolňuje. 100 mikrolitrů takto vzniklé suspenze se naočkuje přímo na krevní agar a rozočkuje sterilní kličkou po celém povrchu krevního agaru. Dle pokynů vyučujícího proveďte metodu sonifikace katétru. Naočkováné krevní agary umístěte do termostatu do 37 °C.

Na připravené Petriho misce spočítejte množství kolonií narostlých na krevním agaru a vypočítejte počet bakterií adheující na povrch katétru. Je-li kolonií evidentně více než 100, napište „> 100“.

Výsledky:

	3a	3b	3c
Odhad počtu mikrobů			

Kterým z uvedených postupů je možno detekovat a kvantifikovat bakterie nejen z biofilmu

přítomného na povrchu katétru, ale i v jeho lumen? _____

Které metody umožňují kvantifikovat množství bakterií adherovaných na povrchu katétru?

Jaký má smysl kvantifikace mikroba izolovaného z katétru? _____

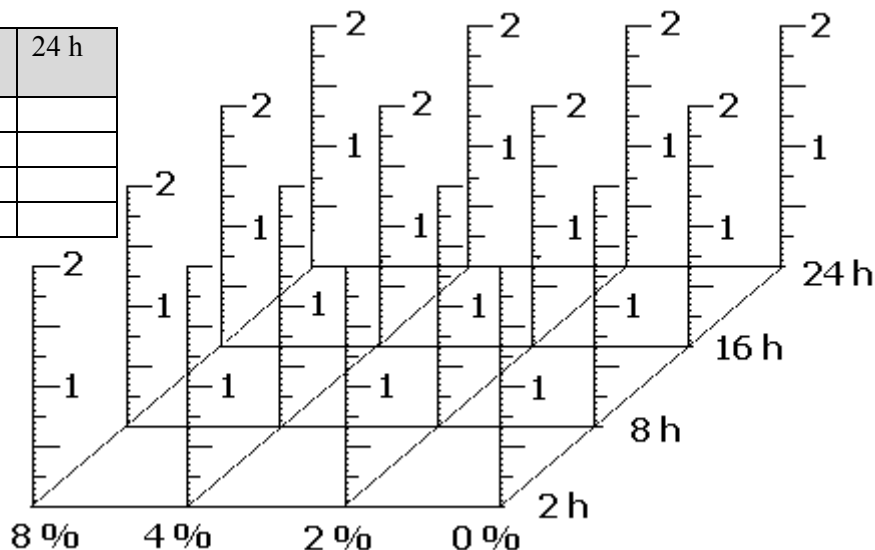
Úkol 4: Vliv přítomnosti sacharidů na dynamiku růstu biofilmu

Do jednotlivých důlků mikrotitrační destičky obsahující BHI médium doplněné 0 %, 2 %, 4 %, 8 % glukózy byl inokulován kmen *Streptococcus mutans*. Po 2, 8, 16, 24 hodinách kultivace při 37 °C byly příslušné důlky třikrát promyty. Vrstva vytvořeného biofilmu, která zůstala pevně adherovaná na stěnách jamek mikrotitrační destičky, byla obarvena 20minutovým působením genciánové violeti. Přebytečné barvivo bylo odstraněno z jamek opatrným promytím. Intenzita zbarvení jamek se měří spektrofotometrem a odpovídá tloušťce vytvořené biofilmové vrstvy.

Na přiloženém papíře jsou výsledky spektrofotometrického měření intenzity zbarvení důlků. Z předložených výsledků sestrojte prostorový graf dynamiky tvorby biofilmu v závislosti na čase a koncentraci glukózy. (Pro každou koncentraci a čas je změřeno šest důlků, vyberte vždy hodnotu přibližně průměrnou, není nutno počítat průměr přesně.)

Průměrné hodnoty*	2 h	8 h	16 h	24 h
0 %				
2 %				
4 %				
8 %				

* hodnoty absorbance, přibližný průměr ze všech šesti důlků, které byly podrobeny stejné koncentraci glukózy po stejný čas



Jak ovlivňuje doplnění média glukózou tvorbu biofilmu?

Úkol 5: Citlivost biofilmopozitivních mikrobu k antimikrobiálním látkám (srovnání planktonické a biofilmové formy mikroba)

V destičce č. 1 je stanovena MIC pro planktonickou formu *S. epidermidis*. Stejný kmen byl kultivován tak, aby vytvořil biofilm na stěnách důlků mikrotitrační destičky. Na tento biofilm poté působila antibiotika ve stejných koncentracích jako v destičce č. 1. Po 18 hod. působení byla antibiotika odstraněna a do důlků bylo přidáno kolorimetrické médium (destička č. 2) Přítomnost živých bakteriálních buněk vede ke změně barvy tohoto média (z červené na žlutou). Dle přiložených interpretačních tabulek zjistěte MIC pro planktonickou formu a koncentrace antibiotik schopných zasáhnout buňky v biofilmu a tak je eradikovat (minimální biofilm eradikující koncentrace, MBEC). Pokud jsou v případě MBEC všechny důlky žluté, zapíšte u MBEC např. „> 1024“, bude-li 1024 mg/l největší koncentrace daného antibiotika ve druhé destičce.

Antibiotikum	<i>S. epidermidis</i> – planktonická forma	<i>S. epidermidis</i> – růst v biofilmové formě
	MIC	MBEC

Kontrolní otázky:

1. Co to je biofilm?
2. Jaké jsou hlavní složky biofilmu?
3. Jaký je význam orálního biofilmu z hlediska tvorby zubního kazu?
4. Na kterých dalších onemocněních se biofilm podílí?
5. Co komplikuje léčbu biofilmových infekcí?
6. Jaké jsou předpokládané příčiny vyšší rezistence biofilmu k antibiotikům?
7. Co jsou to fokální infekce?
8. Jakým způsobem měříme absorbanci (u reakcí ELISA či u detekce tvorby biofilmu)?