

Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE



Díl jedenáctý:

Pachatel v organizované skupině
aneb

Bakteriální biofilm

Na úvod

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)

Přehled témat

Klinické případy spojené s biofilmem

Základní charakteristika biofilmu

Diagnostické a experimentální metody u biofilmu

Obrázky biofilmu

Bonus: Více o biofilmu

Klinické případy spojené s biofilmem

Příběh první (tentokrát skutečný)

- 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)

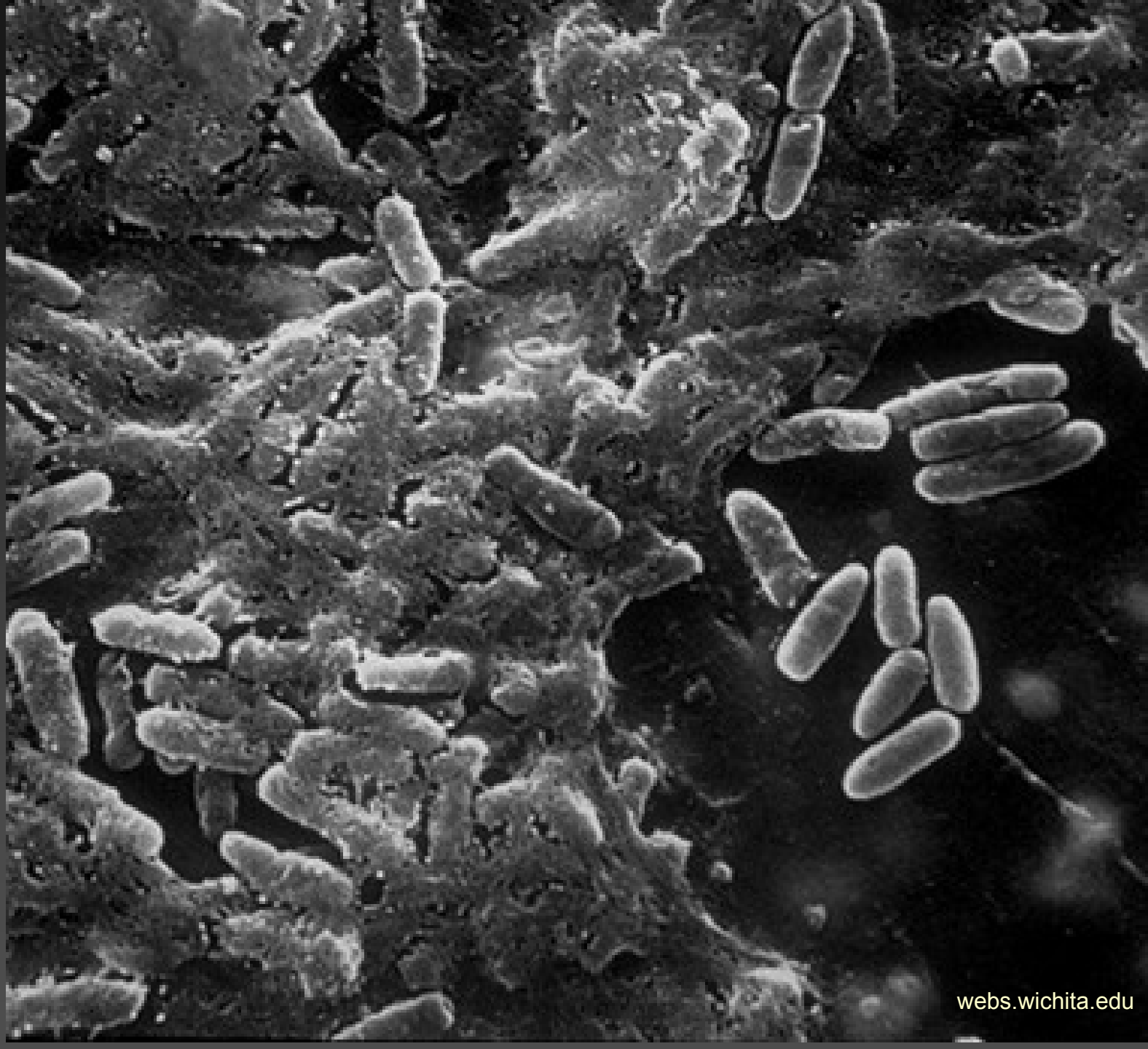
Příběh – pokračování

- Zpočátku vždy dobrá odezva, poté se objevují **ataky teplot i v průběhu terapie**.
- Při transesofageálním vyšetření **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**.

Katetrový biofilm



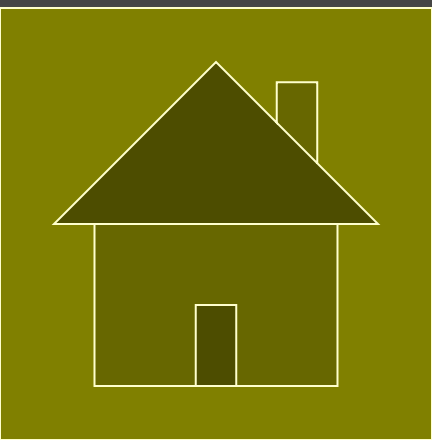
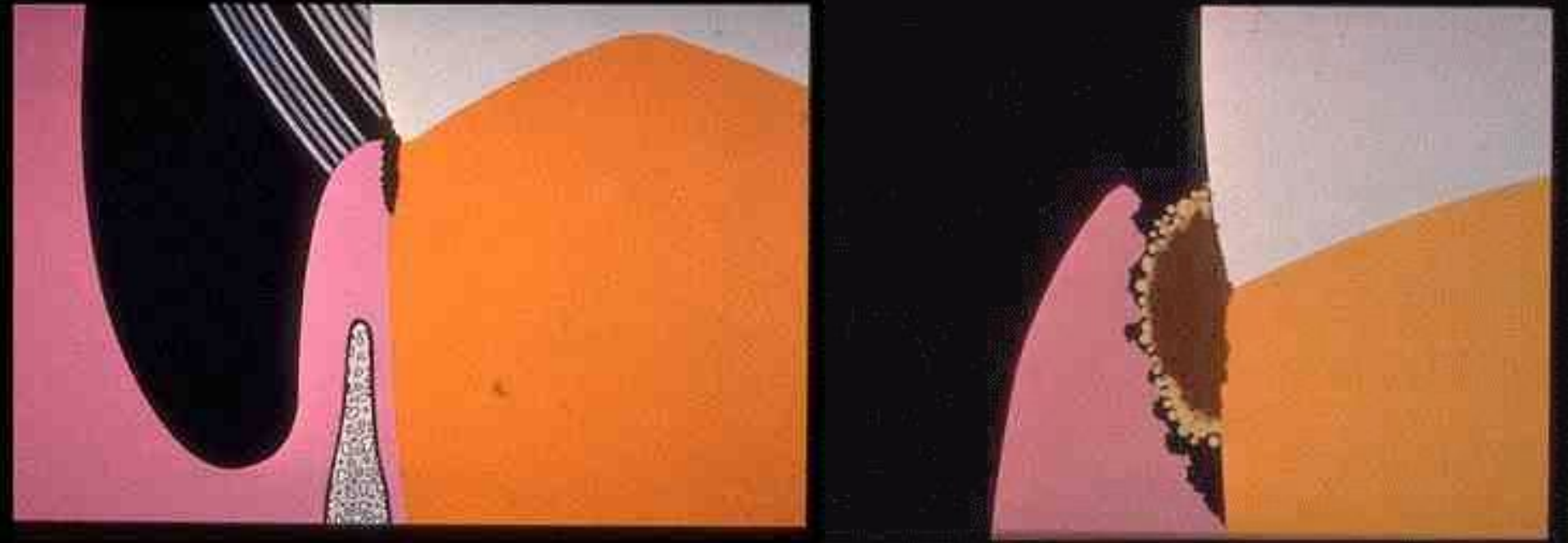
Příběh druhý

- Michal byl **13letý kluk**. Nenáviděl rodiče a rozhodl se udělat cokoli, co bude proti nim..
- Rozhodl se, že jedna z metod boje s rodiči by mohla být blokáda všeho, co po něm rodiče chtějí.
- A tak si **přestal čistit zuby**, udržovat pořádek ve svém pokoji a dělat některé další podobné věci.
- Brzy ho ale začaly **bolet zuby**. Musel k zubaři, který konstatoval **těžký zubní kaz**. Zubařka mu zuby spravila, ale také nemilosrdně trvala na tom, že si musí začít zuby zase čistit, jinak že bude mít problémy znova – ne jen s ní (a ostatními z generace „vraťte-se-do-hrobu“), ale hlavně s vlastními zuby.

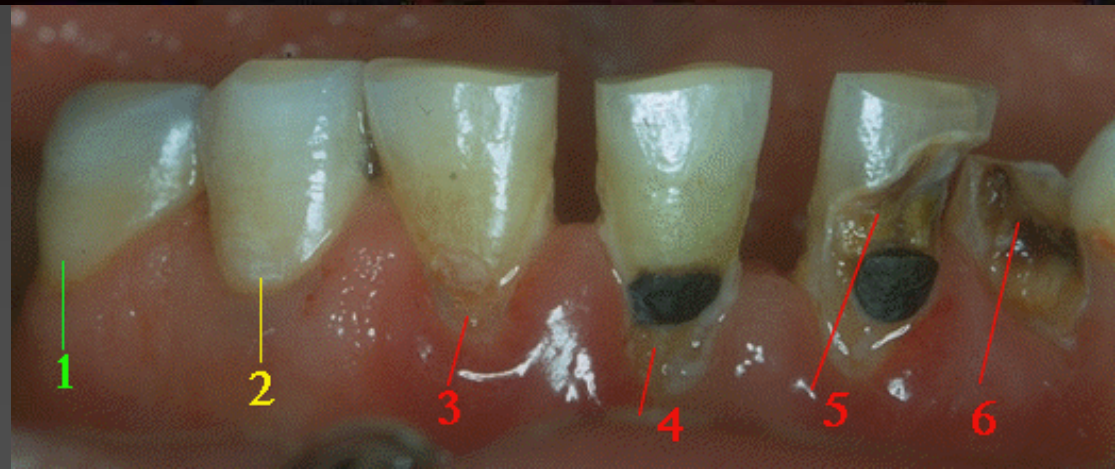
Zločincem byl

- ...opět přerostlý biofilm.
- **V ústní dutině je biofilm normální.** Je dokonce užitečný: normální ústní flóra se organizována ve formě biofilmu, a tak se může bránit vnějším vlivům včetně patogenních agens
- Nicméně **příliš přerostlý biofilm** (jako výsledek příliš velkého množství zkonsumovaných cukrů a příliš malého čištění zubů) způsobuje, že biofilm se stává **nepřítelem, místo aby byl přítelem** pacienta.

Biofilm utekl zubnímu kartáčku a stává se zdrojem kazu



3× webs.wichita.edu



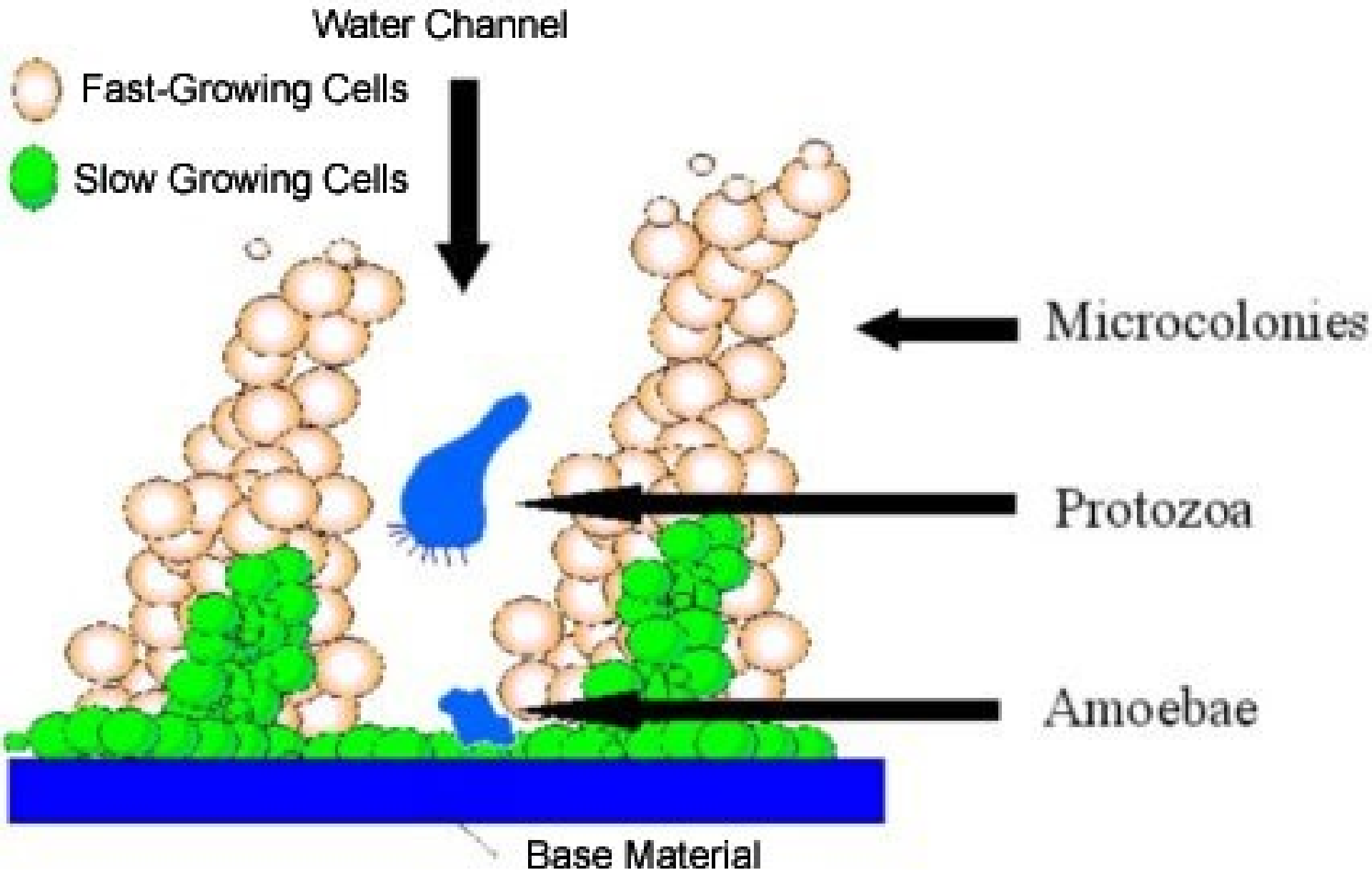
Základní charakteristika biofilmu

Biofilm: co je to?

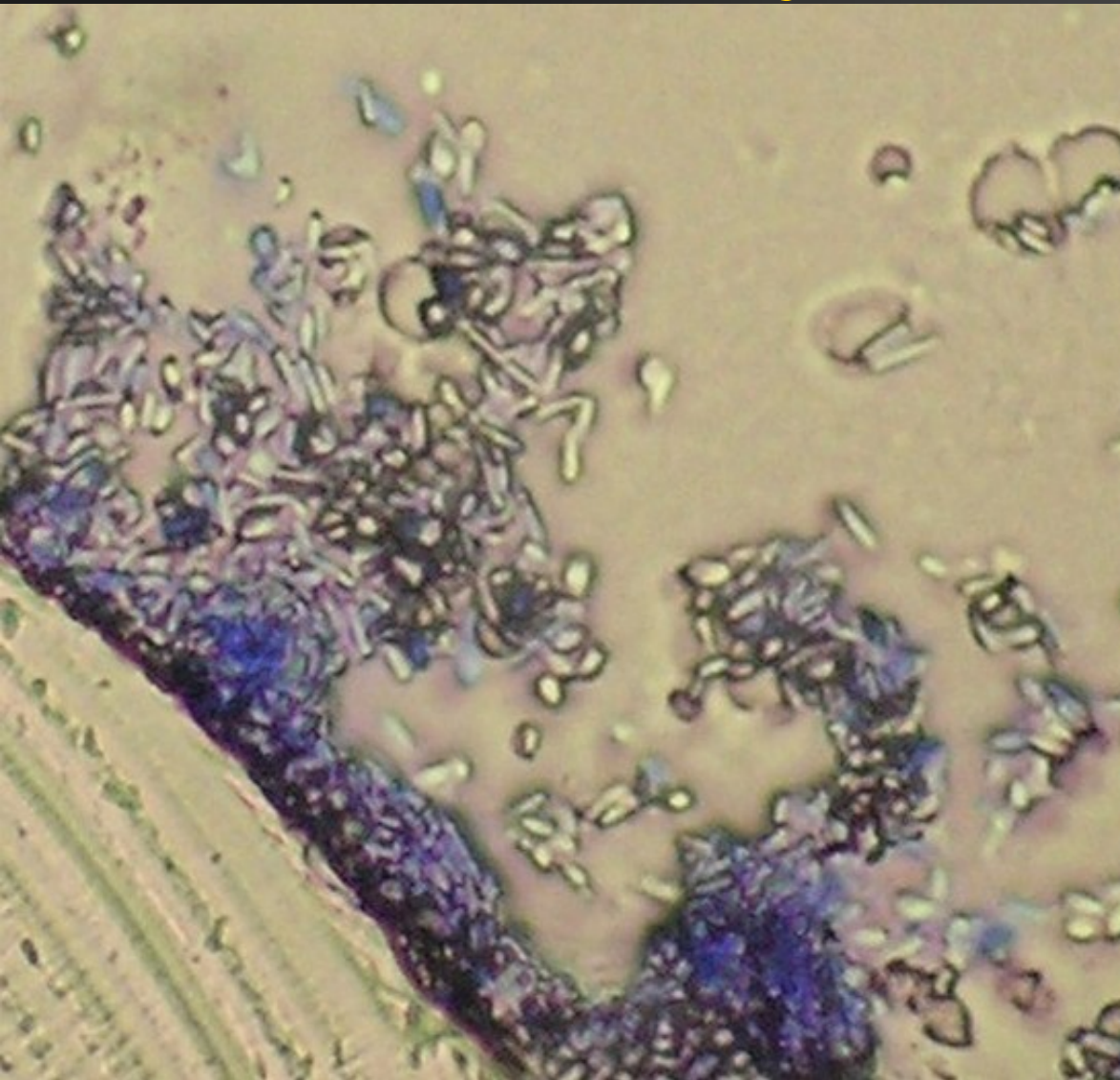
- Biofilm je **komplexní, organizovaná struktura**
- Skládá se z **živých buněk** (většinou bakterií), **hmot** jimi produkovaných (většinou polysacharidů) a **kanálek**
- Není přítomen jen v živých organismech, ale i **v prostředí**. Například kámen, na které jsme uklouzli v létě v řece či rybníku, byl asi pokryt biofilmem. Biofilm je významný i například v potravinářství



Biofilm v řece

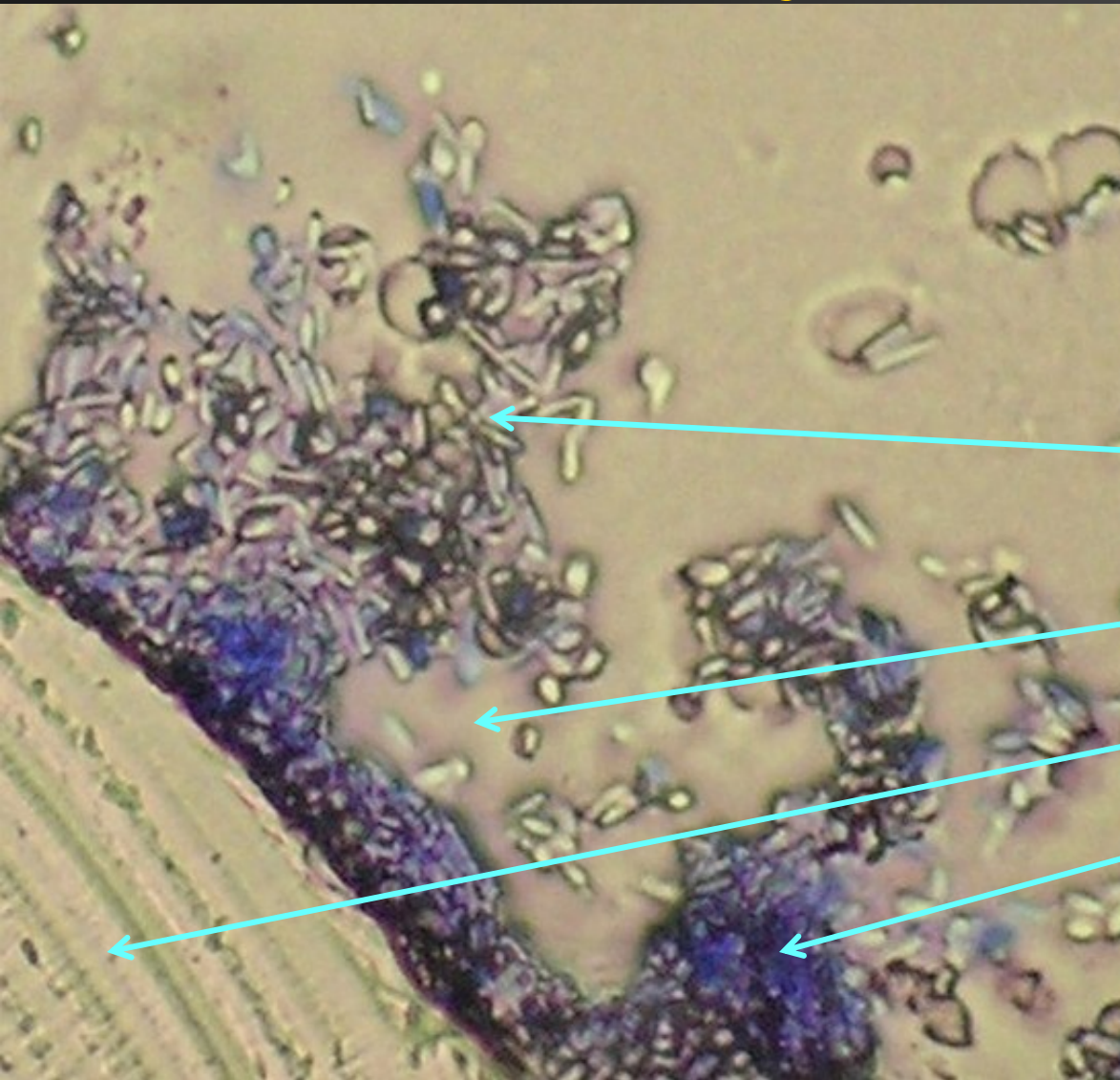


Různé obrázky biofilmu



Biofilm na katetru

Různé obrázky biofilmu



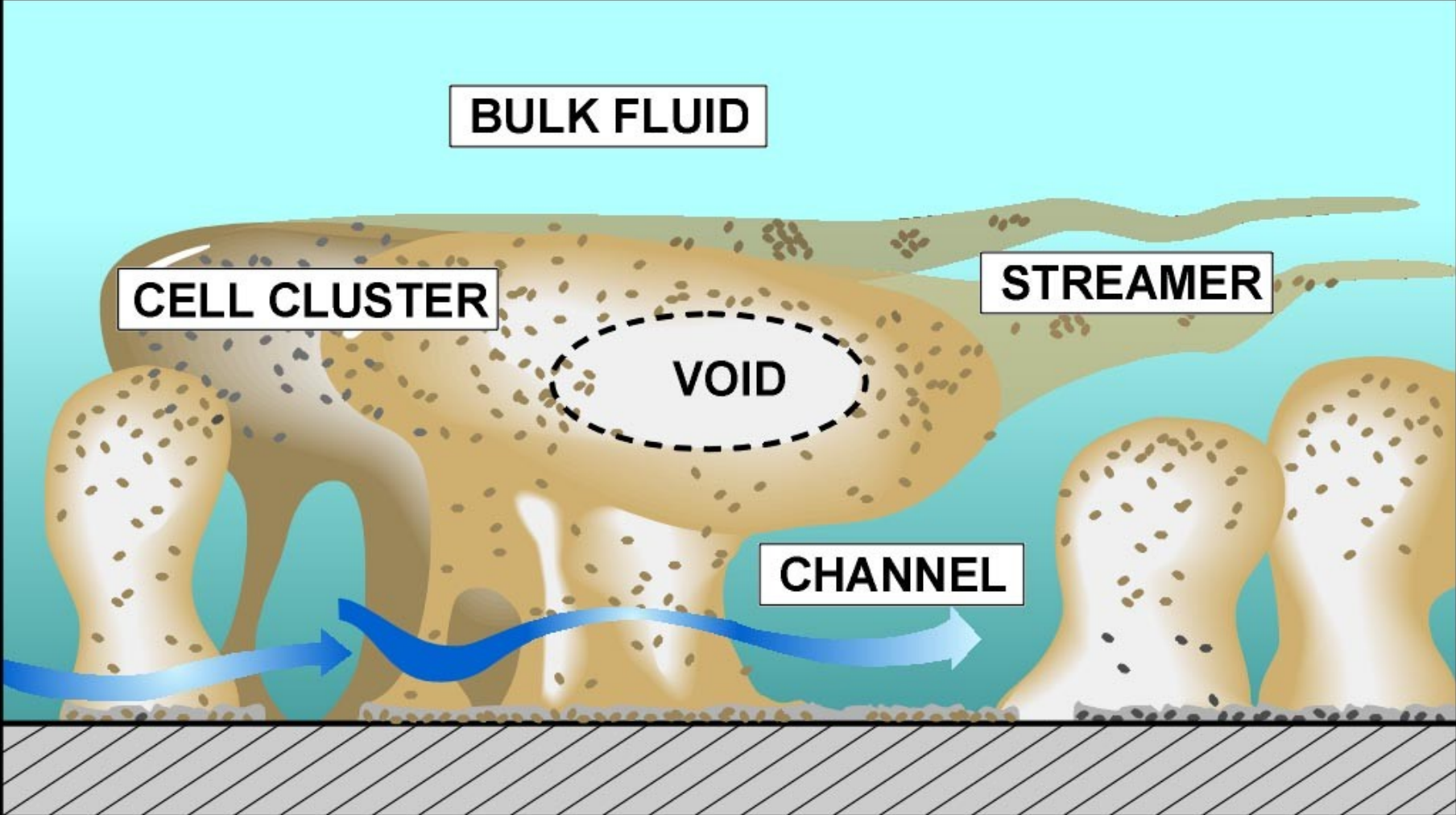
Biofilm na katetru

Bakterie

Kanálek

Katetr

Polysacharidy



Vznik biofilmu

- Na začátku je pevný povrch a plovoucí bakterie



- Bakterie **adheruje** na povrch



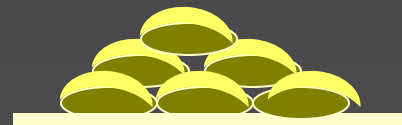
- Následuje **agregace** dalších bakterií



- Bakterie začnou produkovat **polysacharidovou matrix**

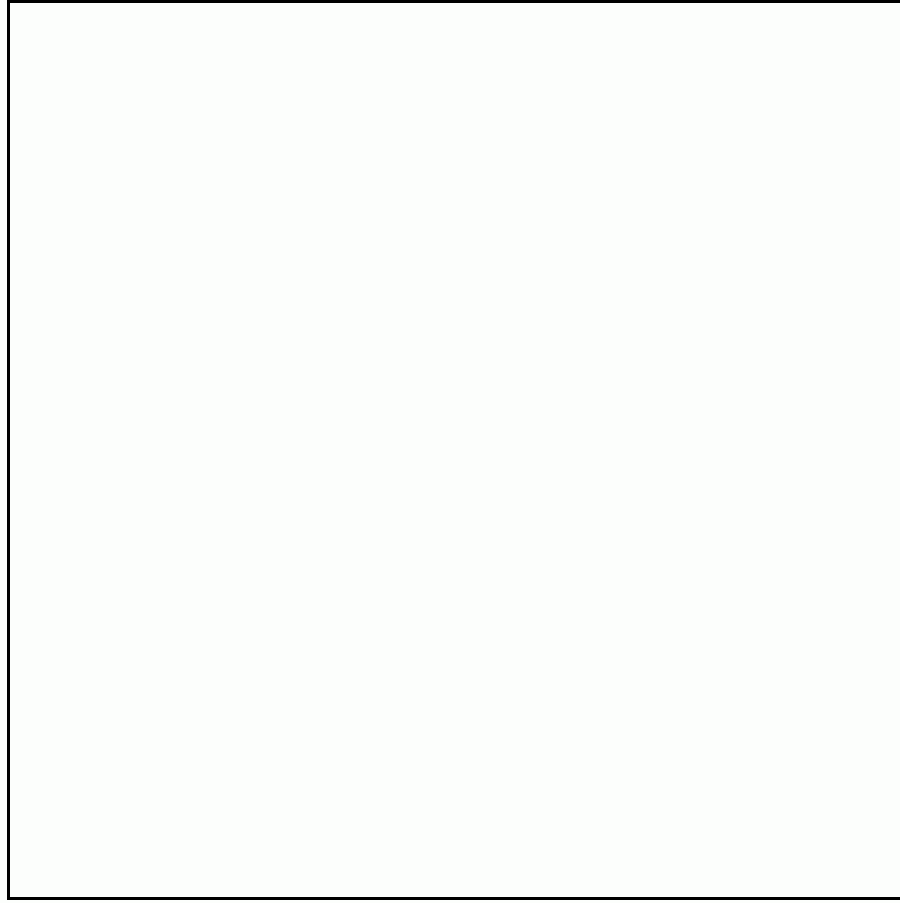
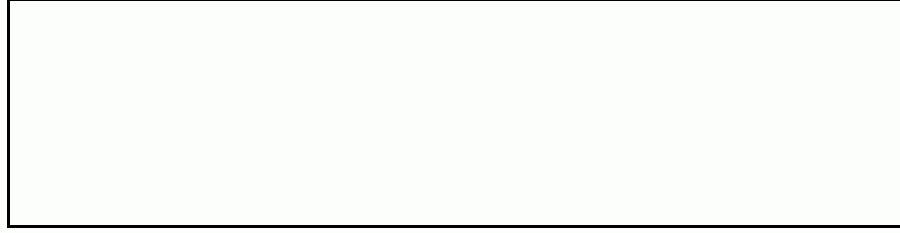


- Až vznikne **třídímenzionální struktura zvaná biofilm**

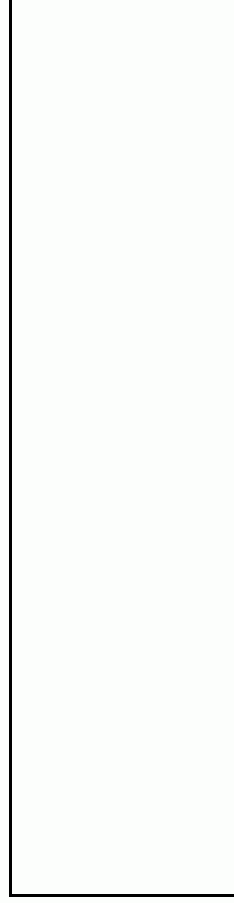


Biofilm může být **jedno- či vícedruhový**

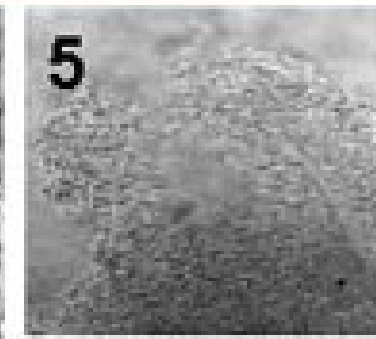
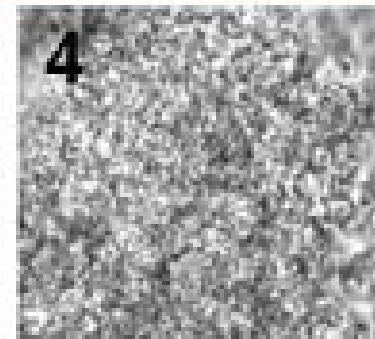
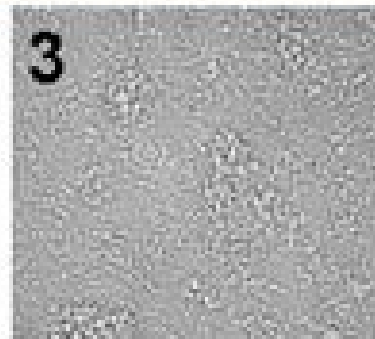
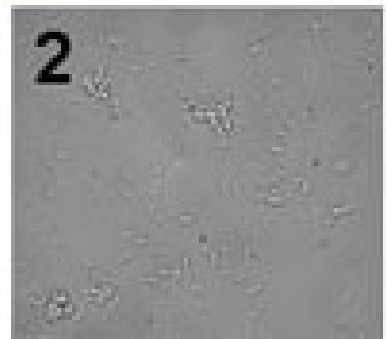
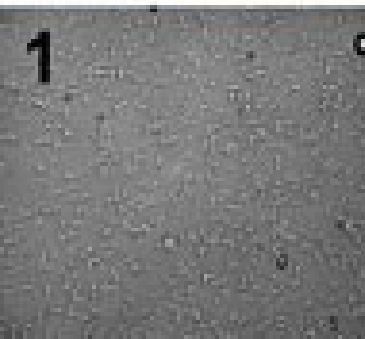
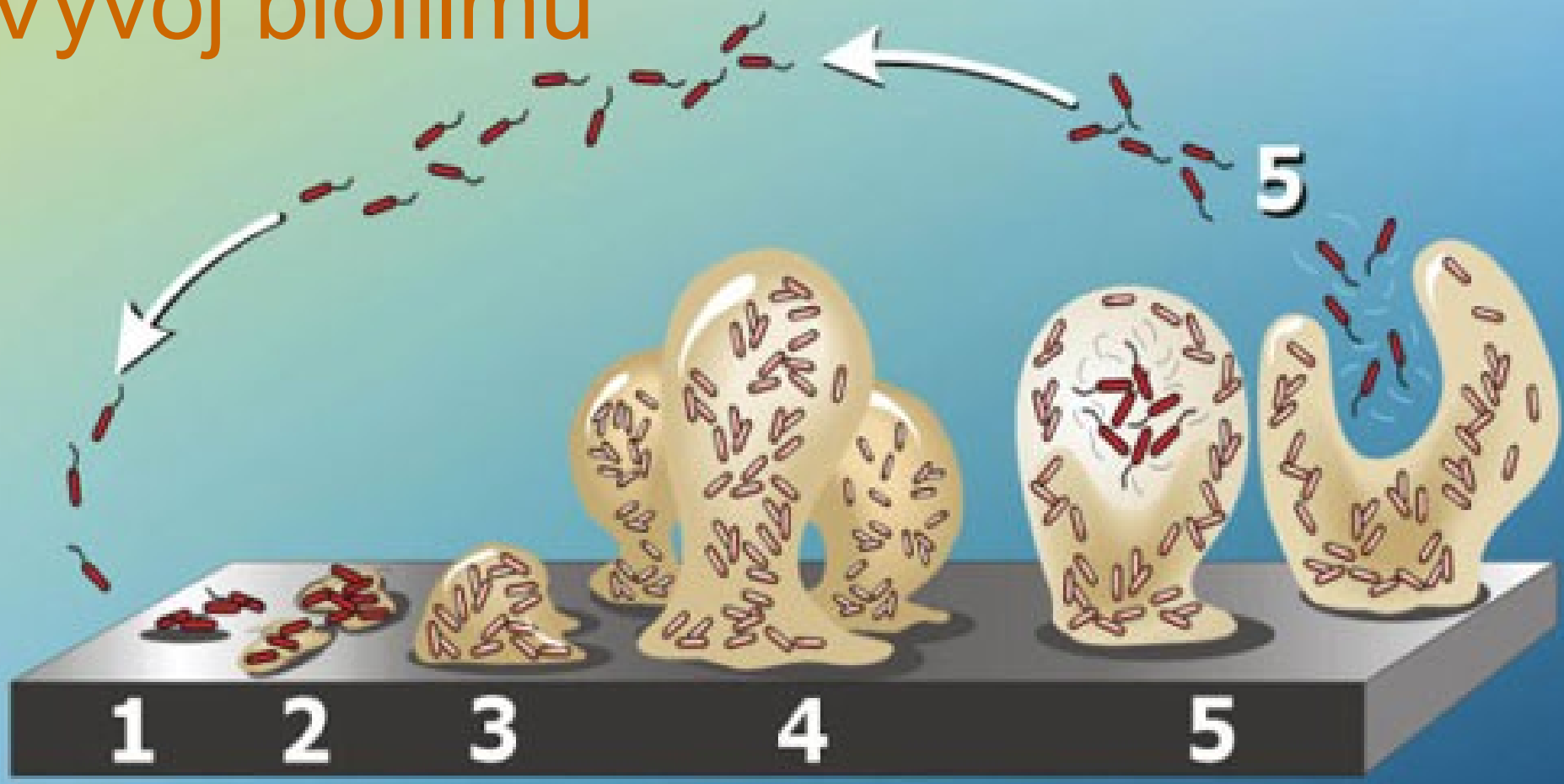
Vznik biofilmu v časovém sledu



0 h



Vývoj biofilmu



Vývoj biofilmu, jiné schema

webs.wichita.edu

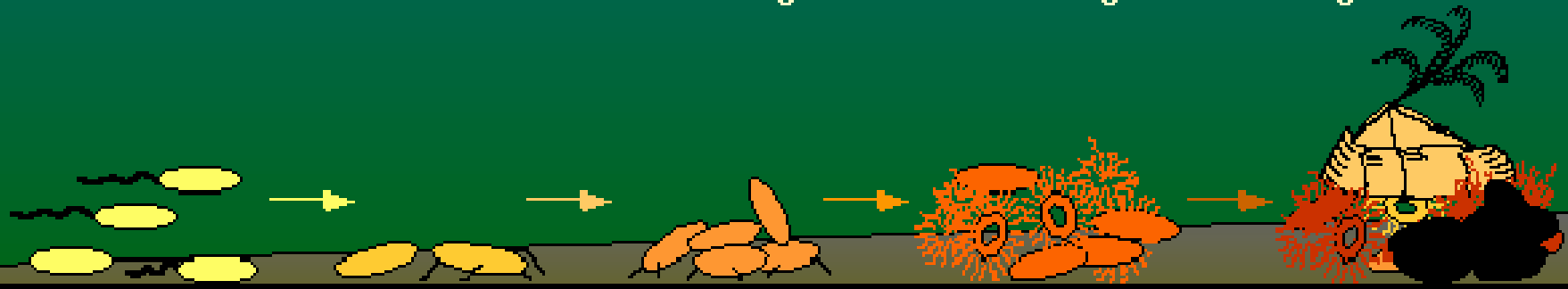
REVERSIBLE
ADSORPTION
OF BACTERIA
(sec.)

IRREVERSIBLE
ATTACHMENT
OF BACTERIA
(sec.-min.)

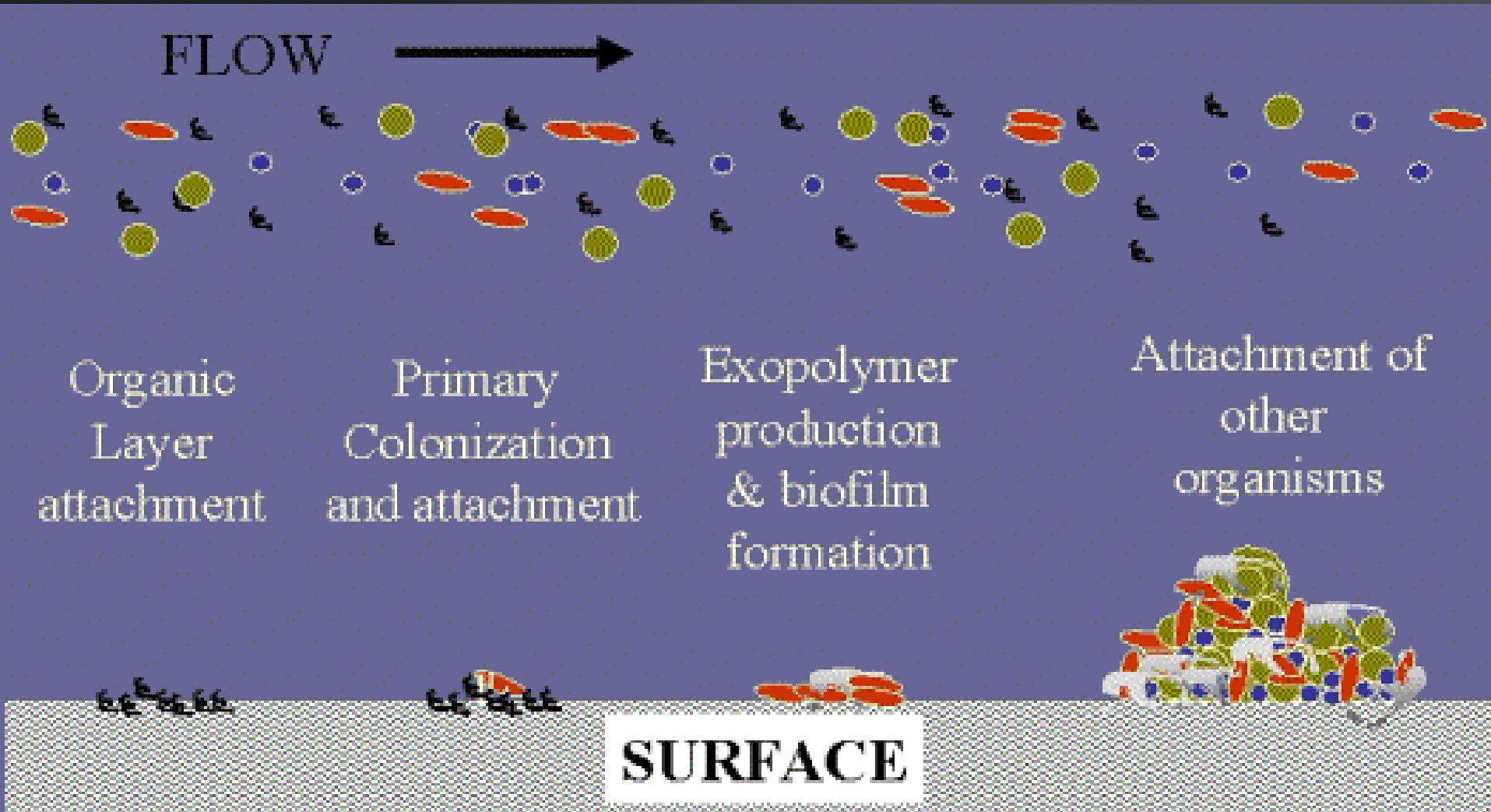
GROWTH &
DIVISION
OF
BACTERIA
(hrs.-days)

EXOPOLYMER
PRODUCTION
& BIOFILM
FORMATION
(hrs.-days)

ATTACHMENT
OF OTHER
ORGANISMS TO
BIOFILM
(days-months)



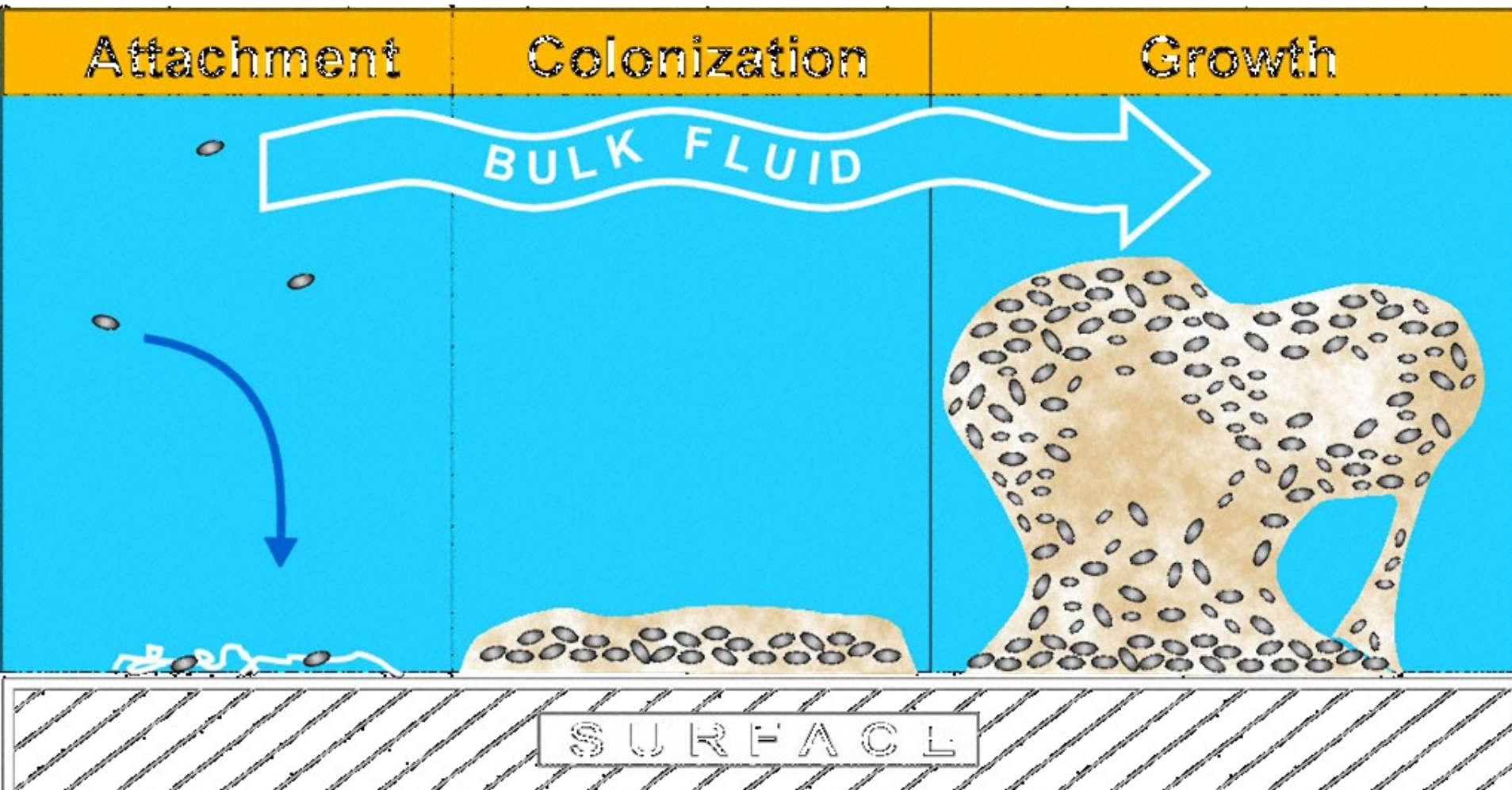
Vývoj biofilmu



Vývoj biofilmu, jiné schema

www.uweb.engr.washington.edu

Biofilm formation:



Význam tvorby biofilmu u bakterií

Bakterie mohou lépe regulovat početnost populace – v rámci biofilmu se totiž informují produkcí určitých látek (tzv. quorum sensing)

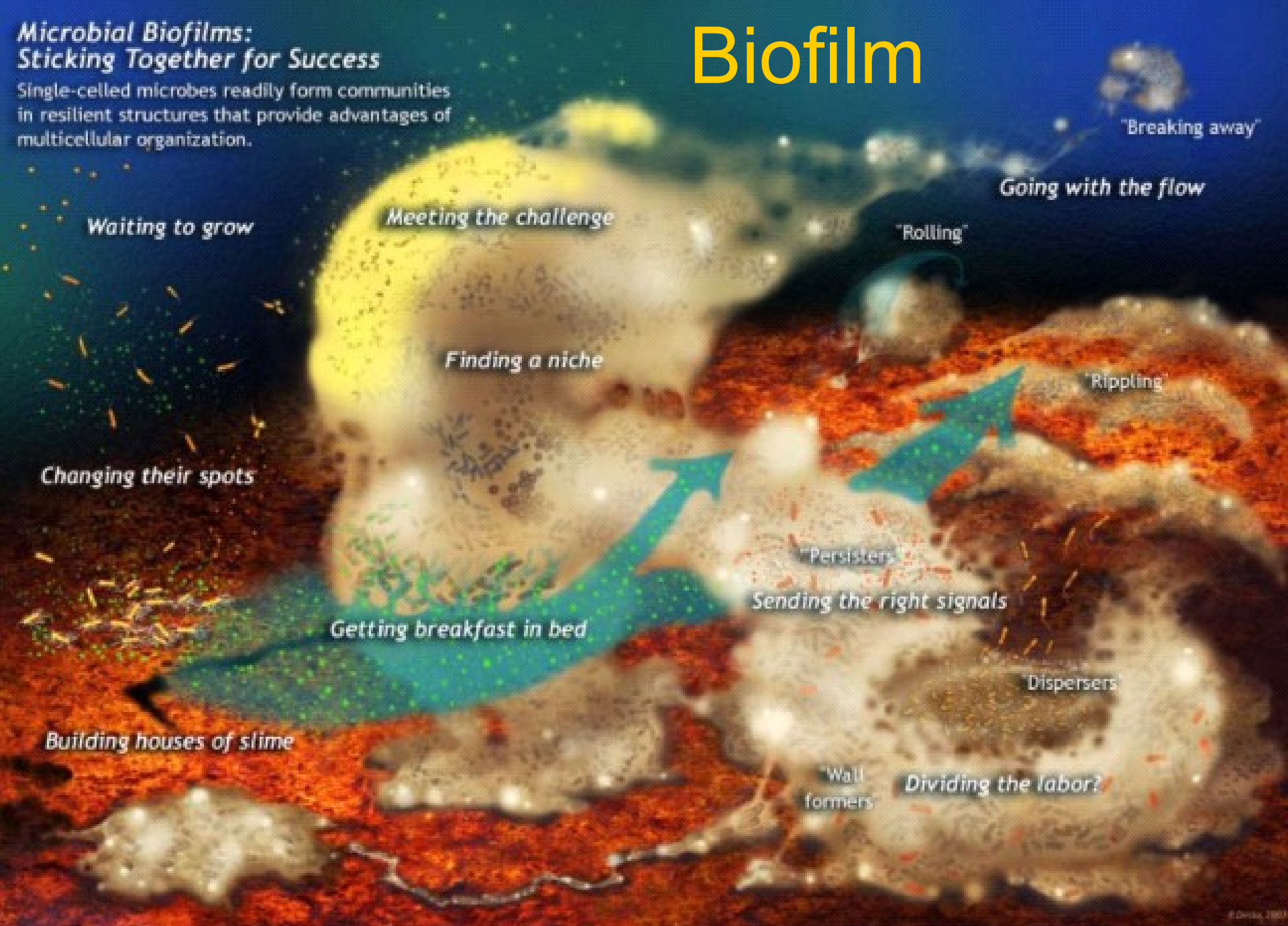
Bakterie se stávají odolnější vůči vnějším vlivům, např.:

- desinfekčním prostředkům
 - antibiotikům
 - imunitní reakci hostitele
- *Biofilm tvoří jak bakterie běžné flóry (z hlediska organismu spíše pozitivní), tak i patogeny.*

Biofilm

Microbial Biofilms: Sticking Together for Success

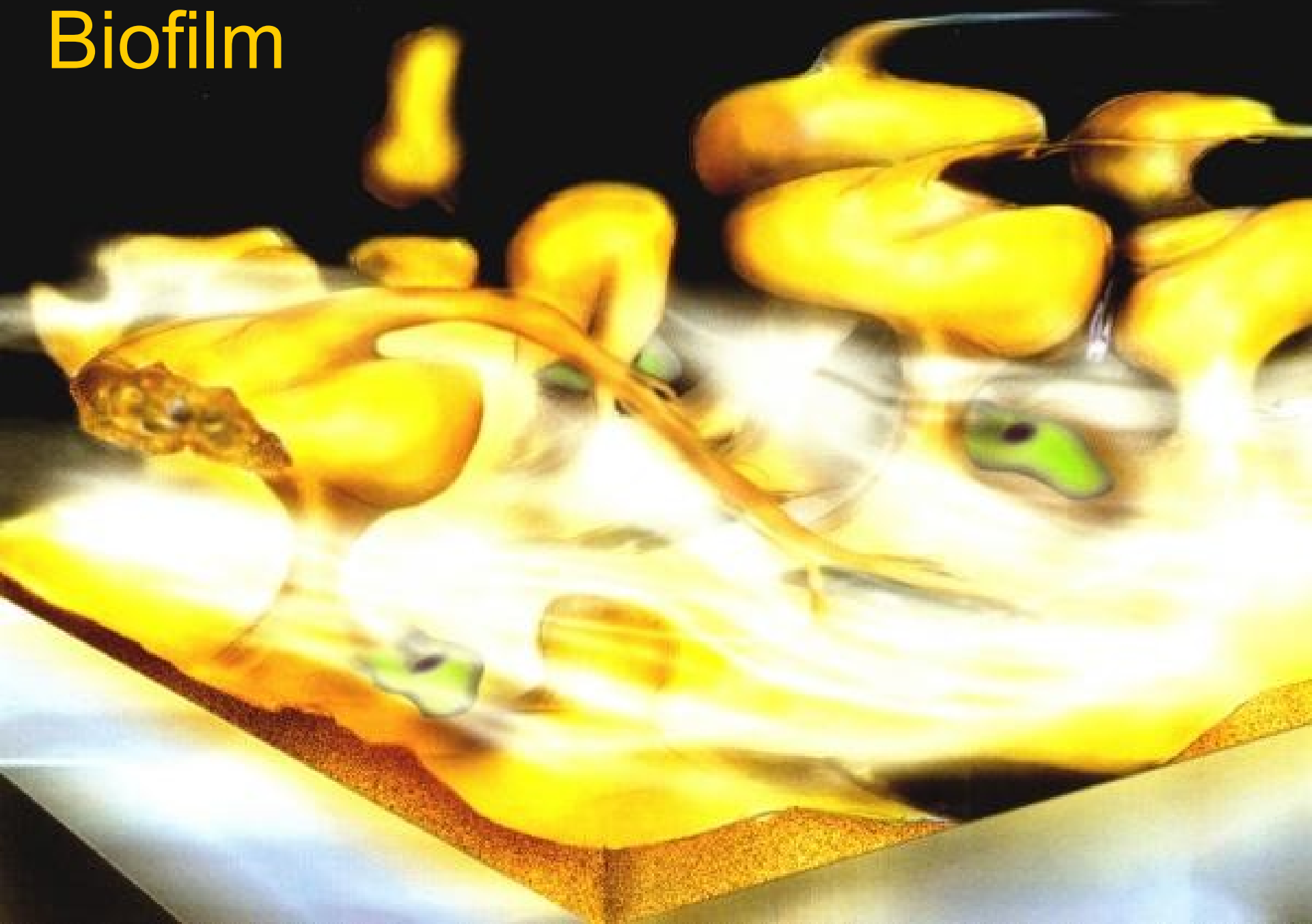
Single-celled microbes readily form communities in resilient structures that provide advantages of multicellular organization.



Mechanizmy ovlivňující rezistenci k antibiotikům

- Vliv povrchového náboje
- Snížení růstové rychlosti
- Penetrační bariéra
- Nehomogenní matrix
- Fenotypové odlišnosti
- Intercelulární signalizace
- Imunitní mechanismy...

Biofilm



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**
- V budoucnu se určitě budeme pokoušet přímo rozbít biofilm, například pomocí enzymoterapie

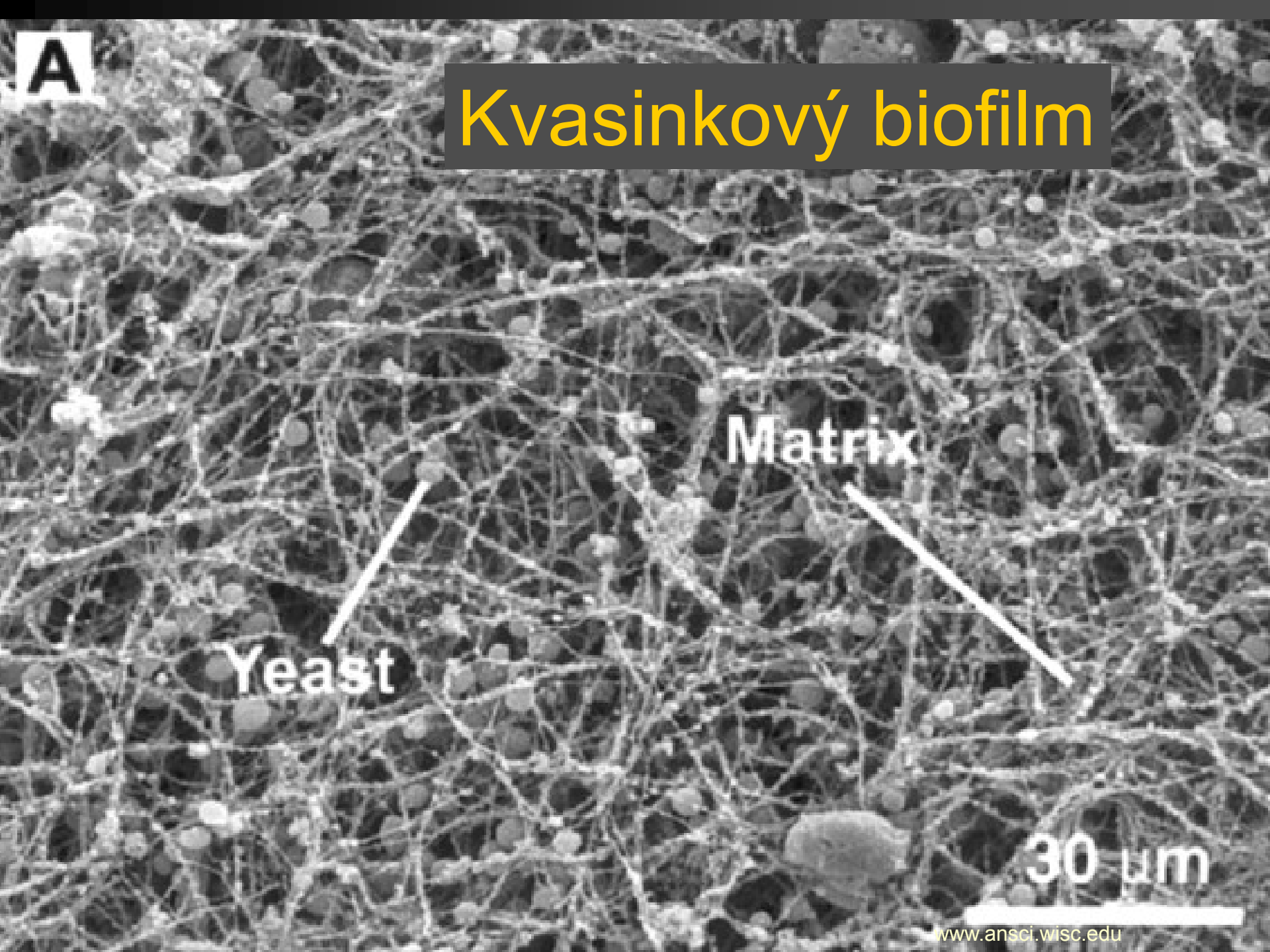
A

Kvasinkový biofilm

Yeast

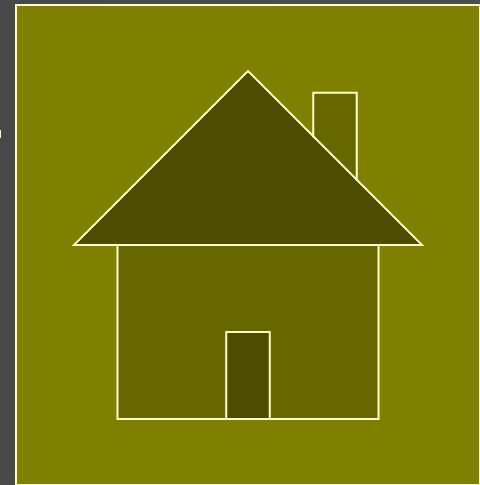
Matrix

30 μ m



Prevence

- Katétry a kostní cementy
 - vyrobené z **nové generace plastů** (snížení rizika adheze a tvorby biofilmu)
 - s **koloidním stříbrem** a dalšími povrchově aktivními látkami
 - s **antimikrobiálními substancemi**, např.
 - minocyklin
 - rifampicin
- Proplachy katétrů
- Dodržování pravidel asepse, správné dekontaminační postupy apod.



Diagnostické a experimentální metody u biofilmu

Biofilm a mikrobiologická diagnostika

a) Průkaz biofilmu

aa) fenotypovými metodami (Christensenova metoda, Kultivace na agaru s kongo červení)



Foto: Archiv Veroniky Holé



ab) genotypovými metodami

b) Stanovení **citlivosti bakterií** v biofilmu k jednotlivým antibiotikům (MBEC)

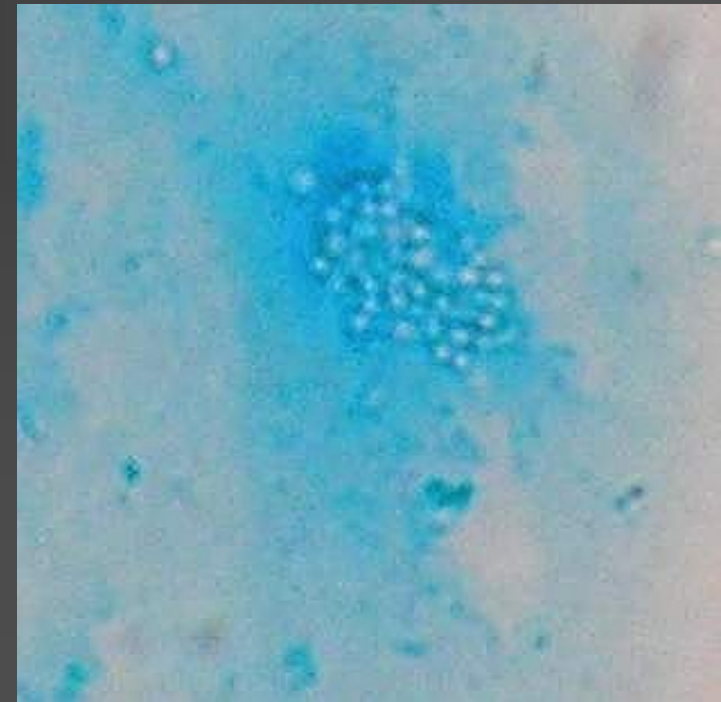
c) **Zohlednění tvorby biofilmu** při běžné bakteriologické diagnostice: např. při kultivaci žilních katetrů se volí specifické metody (viz dále) namísto klasického pomnožení v bujónu

Mikroskopie orálního biofilmu

Vedle oficiálních metod pro průkaz biofilmu existují i další možnosti, jak zviditelnit biofilm.

V případě orálního biofilmu:

- **Gramovo barvení** umožňuje pozorovat shluky bakterií (G+ i G-) a případně buňky makroorganismu (epitelie apod.). Polysacharidové hmoty zůstávají nezbarvené.
- **Barvení alciánovou modří** naopak umožňuje i znázornění polysacharidového materiálu, tj. nebuněčné části biofilmu, buňky jsou zde znázorněny negativním barvením



Průkaz vlivu čištění zubů na orální biofilm

Foto: Archiv Veroniky Holé



- Dobrovolník má připravený jodový roztok či tablety s barvivem barvícím zubní plak.



- Roztok se nechá působit v dutině ústní cca 2 min.

Foto: Archiv Veroniky Holé

Kultivace bakterií tvořících biofilm

- Pokud bakterie tvoří biofilm, je doporučeno použít před vlastní kultivací materiálu speciální postupy
- V případě kultivace centrálního venózního katétru s předpokládanou kolonizací existují dvě metody. Obě jsou výhodnější než klasická kultivace v bujónu, sonifikace je však ještě o něco lepší než Makiho metoda

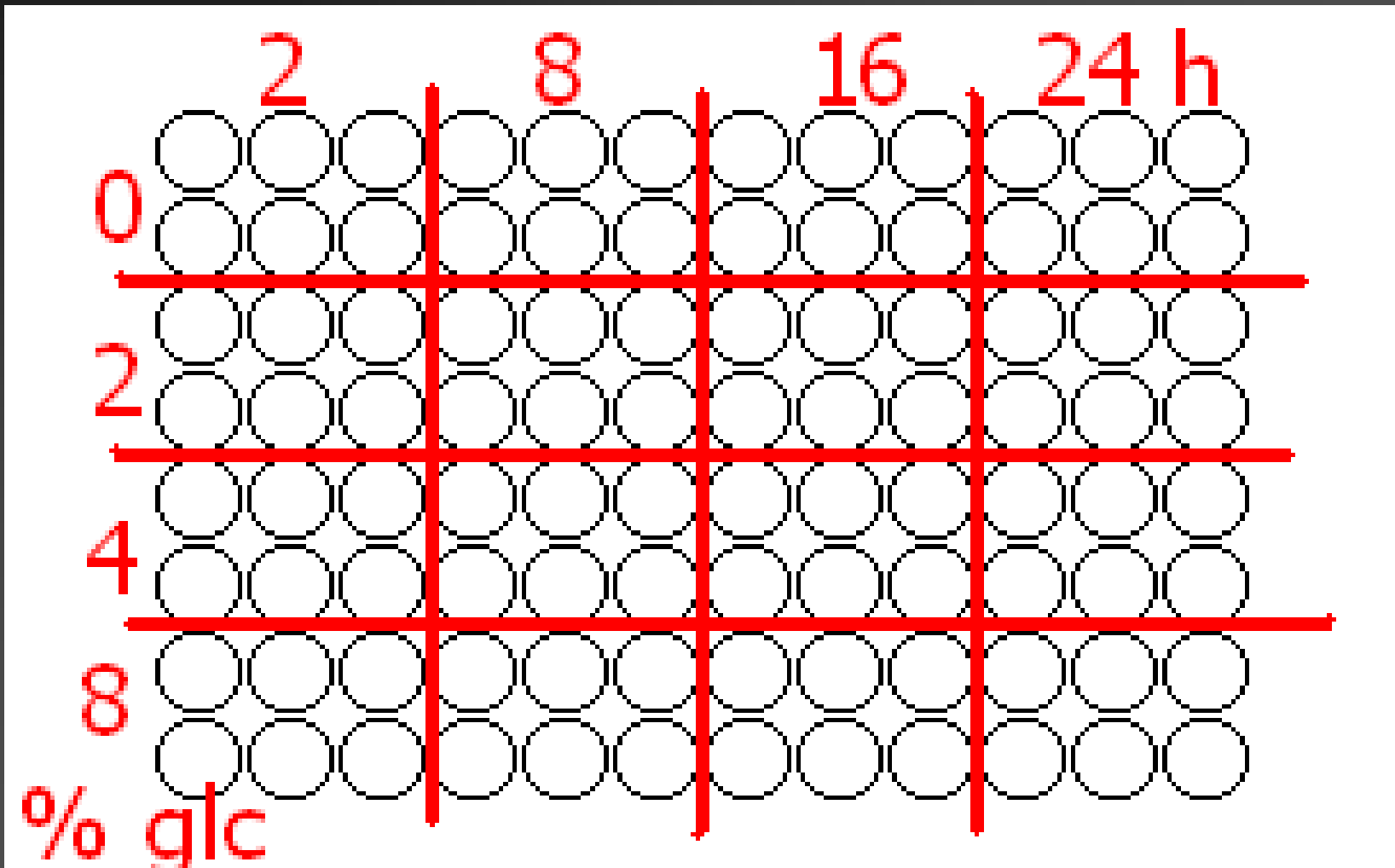
Možnosti

- *Klasická kultivace v bujonu: 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).*
- **Semikvantitativní metoda:** Umožňuje nám zmapovat povrch katétru a semikvantitativně posoudit nález, nevypovídá však o bakteriích v lumen a bakterie se nemusí uvolnit z biofilmu.
- **Sonifikace:** rozrušuje biofilm na povrchu i v lumen katétru. Vyočkování určitého objemu vzorku je kvantitativní metoda, takže dává možnost posoudit množství mikrobů.

Průkaz vlivu přítomnosti sacharidů na tvorbu zubního plaku

- Princip pokusu je jednoduchý. Na plastovém důlku (který imituje povrch zubu) je kultivována jedna z ústních bakterií při různých koncentracích glukózy a po různě dlouhé časové úseky
- Vzniklý biofilm je poté vizualizován genciánovou violetí a jeho intenzita je kvantifikována ve formě absorpance pomocí spektrofotometru

Aby se zabránilo náhodné chybě, má vždy šest sousedních důlků stejné hodnoty koncentrace glc i času



Staré a nové zkratky pro určování účinnosti antibiotik

MIC – **minimální inhibiční koncentrace** je pojem, který se u antibiotik používá pro označení meze růstu (množení) mikroba

MBC – **minimální baktericidní koncentrace** se používá pro mez přežití bakterie. U virů by se použil pojem „minimální virucidní“ a podobně.

MBIC** – **minimální biofilm inhibující koncentrace

MBEC – **minimální biofilm eradikující koncentrace**

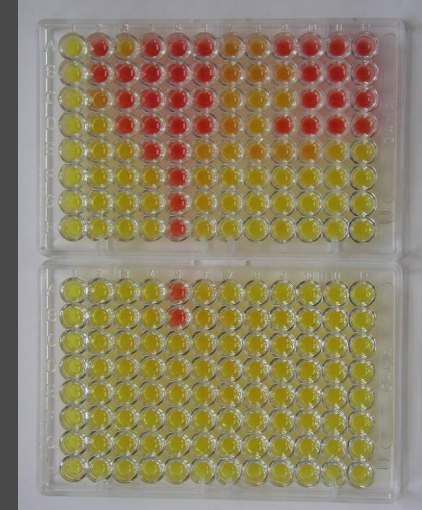
Diagnostické možnosti

– stanovení MBEC

MBEC ... minimální biofilm eradikující koncentrace

*(Existuje také hodnota: **MBIC** ... minimální biofilm inhibující koncentrace – hodnota nepodporovaná všemi vědci)*





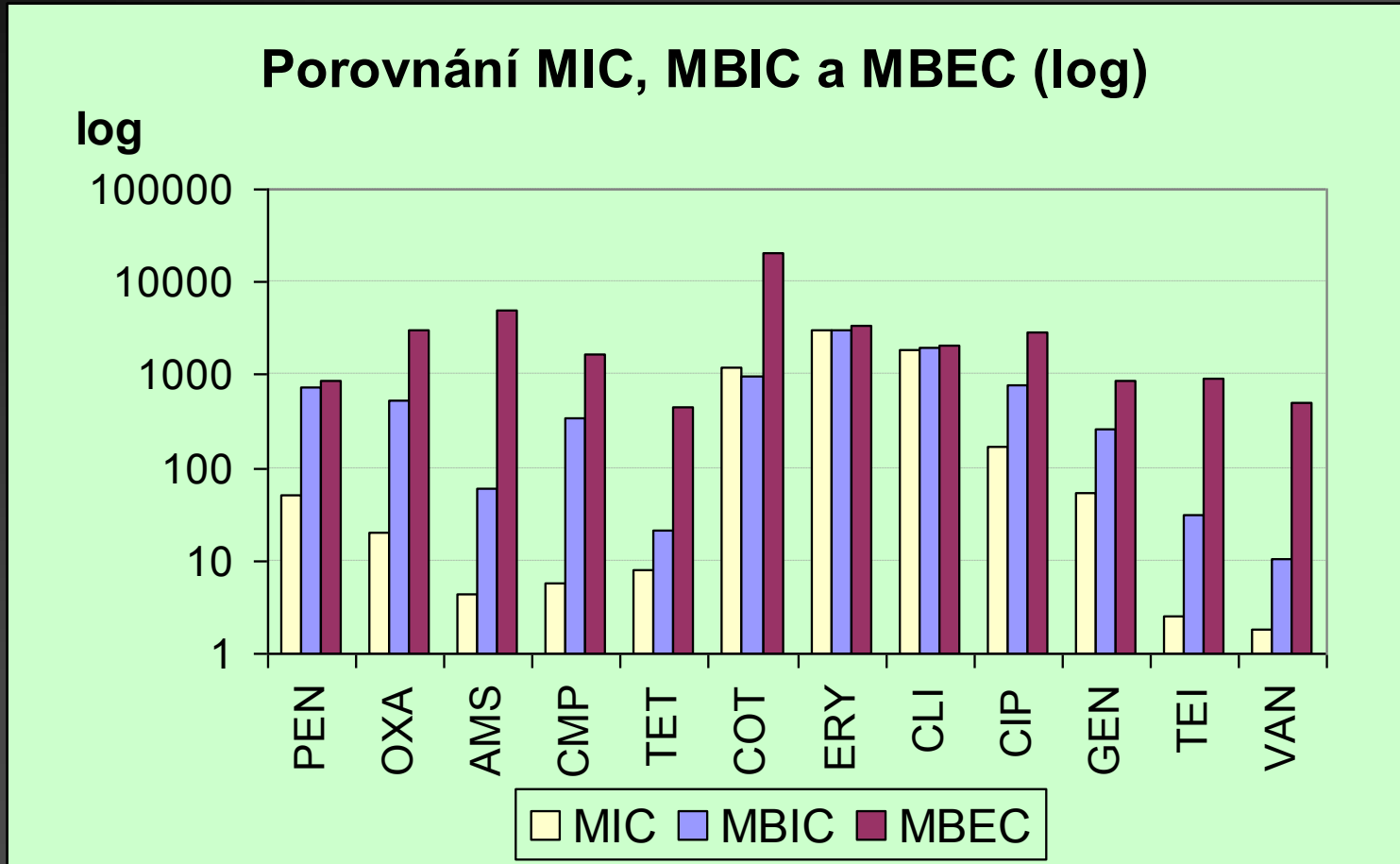
MIC versus MBEC

- Zatímco MIC je metoda určující minimální inhibiční koncentraci ATB u planktonické formy, MBEC zjistí eradikaci bakteriálního biofilmu.

Vypovídá tedy lépe o skutečném účinku antibiotika na bakterie žijící ve formě biofilmu.

- MBEC odpovídá **nejnižší koncentraci antibiotika, kde ještě prokážeme eradikaci biofilmu** (nepřítomnost živých buněk, nedochází ke změně pH média, důlek tedy zůstává červený)

Rozdíly v MIC, MBIC a MBEC – porovnání

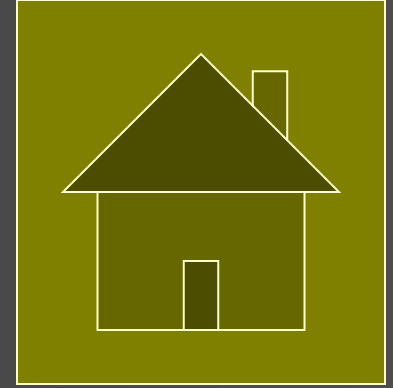


Zkratky antibiotik: pen – penicilin, oxa – oxacilin, ams – ampicilin/sulbactam, cmp – chloramfenikol, tet – tetracyklin, cot – kotrimoxazol, ery – erytromycin, cli – clindamycin, cip – ciprofloxacin, gen – gentamicin, tei – teikoplanin, van – vankomycin

Diagnostické možnosti II.

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

Konec

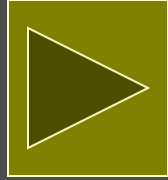


Prezentace byla vytvořena
ve spolupráci ing.
Veroniky Holé, PhD.,
MUDr. Lenky
Černohorské, PhD., a
MUDr. Ondřeje
Zahradníčka

(Studentka K. C.
před čtyřmi lety
zapomněla index,
takže zápočet pak
dostala v hospodě



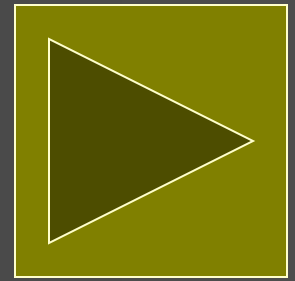
Bonus: více o biofilmu



Kde všude působí biofilm problémy

- **biofilm vzniklý na umělých površích v organismu** člověka i zvířete (katetry, implantáty a podobně)
- méně často **biofilm na přirozených površích** (zde si s tím organismus spíše poradí), ale i zde mohou být komplikace (zubní plak člověka, biofilm v žlázovém epitelu vemene u krávy)
- a samozřejmě také **biofilm na různých površích či v potrubních systémech mimo organismy**, zejména ve vodárenství a potravinářství

Materiály a místa



Na čem se tvoří:

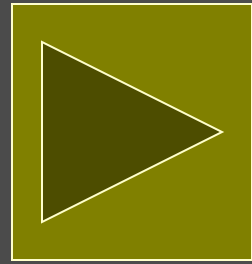
- **nerez**
- **hliník**
- **sklo**
- **teflonu**
- **guma**
- **plasty**

Nejčastější výskyt:

mrtvá místa
výrobního zařízení

- **ventily**
- **klouby**
- **těsnění**
- **apod.**

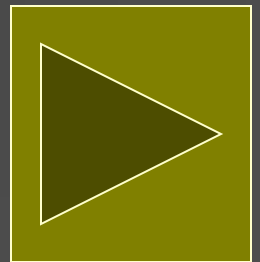
Jaké jsou možné problémy u průmyslových biofilmů



- **zdroj křížových, postpasteračních a poststerilačních kontaminací** → znehodnocení potravinářských produktů, kažení potravin, popř. přenos nálezů potravinami
- **koroze kovových částí zařízení**
- **turbulence protékajících tekutých materiálů** v průtokových trubkách
- **snížení účinnosti a energetické ztráty** v důsledku tvorby tepelné izolační vrstvy ve výměnících tepla

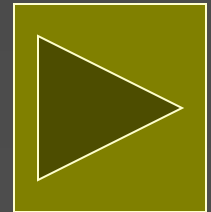
Biofilm jako zdroj dalšího šíření

- Poté, co se biofilm vytvoří, **uvolňují se** z něj **mikroorganismy**, které pak **mohou kolonizovat zase další povrchy**, takže biofilm vzniká na dalších místech
- Neodstraněný biofilm tedy představuje **potenciální riziko** pro vznik biofilmu na jiných místech



Účinnost na biofilm \neq účinnost na bakterie

- Účinnost chemických látek na biofilm jako celek je dána **zcela jinými mechanismy** a vlivy než účinek na bakterie samotné. Často se právě uplatňuje **povrchový náboj**
- Proto **postupy méně účinné na jednotlivé bakterie mohou být účinnější na biofilm**
- U biofilmů **v chirurgických ranách je například důležitější lokální ošetření rány** (např. koloidní stříbro – povrchový náboj) než celkově podaná antibiotika

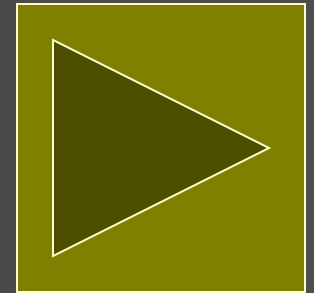


Odstranění biofilmu (obecně)



- **Odstranění povrchu** (výměna zařízení, části potrubí apod.) je samozřejmě radikální krok. Otázkou je, zda se biofilm nevytvoří znovu, bude-li nová část stejné konstrukce
- K **mechanickému odstranění biofilmu** lze přistoupit, pokud to umožňuje situace
- Z **fyzikálních** metod lze použít např. ultrazvuk
- **Chemická cesta** je možná, je však nutné mít ověřeno, že příslušný postup (látka a koncentrace) na biofilm působí. Často se používají chlorové preparáty
- **Kombinace** různých postupů je též možná

Detergenty a desinfekce: možnost kombinace (v průmyslu)

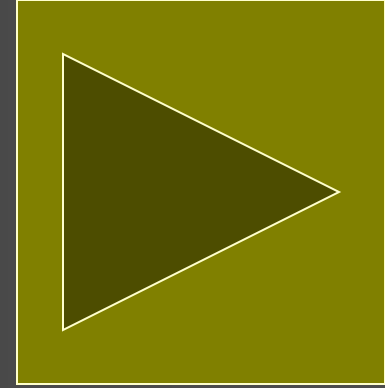


Účinná může být kombinace

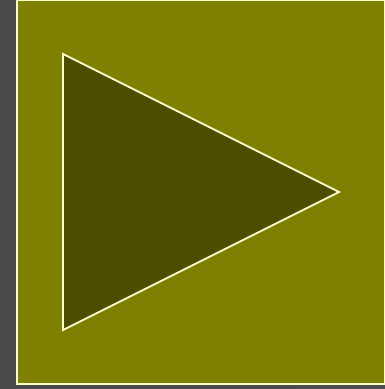
- **působení detergentu**, který rozpustí a rozruší organickou hmotu na povrchu biofilmu, následně
- **opláchnutí** rozrušený biofilm odplaví, a tím obnaží mikroorganismy, a poté
- **desinfekční látka** pronikne dovnitř biofilmu a inaktivuje přítomné mikroorganismy

Nebo lze využít prostředků, které mají účinek detergentu i desinfekčního prostředku; problém je v tom, že vlastní desinfekční účinek detergentů je spíše slabý.

Je možná prevence?

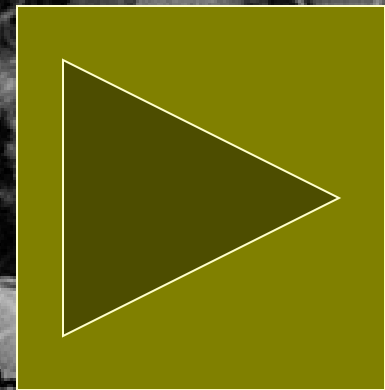
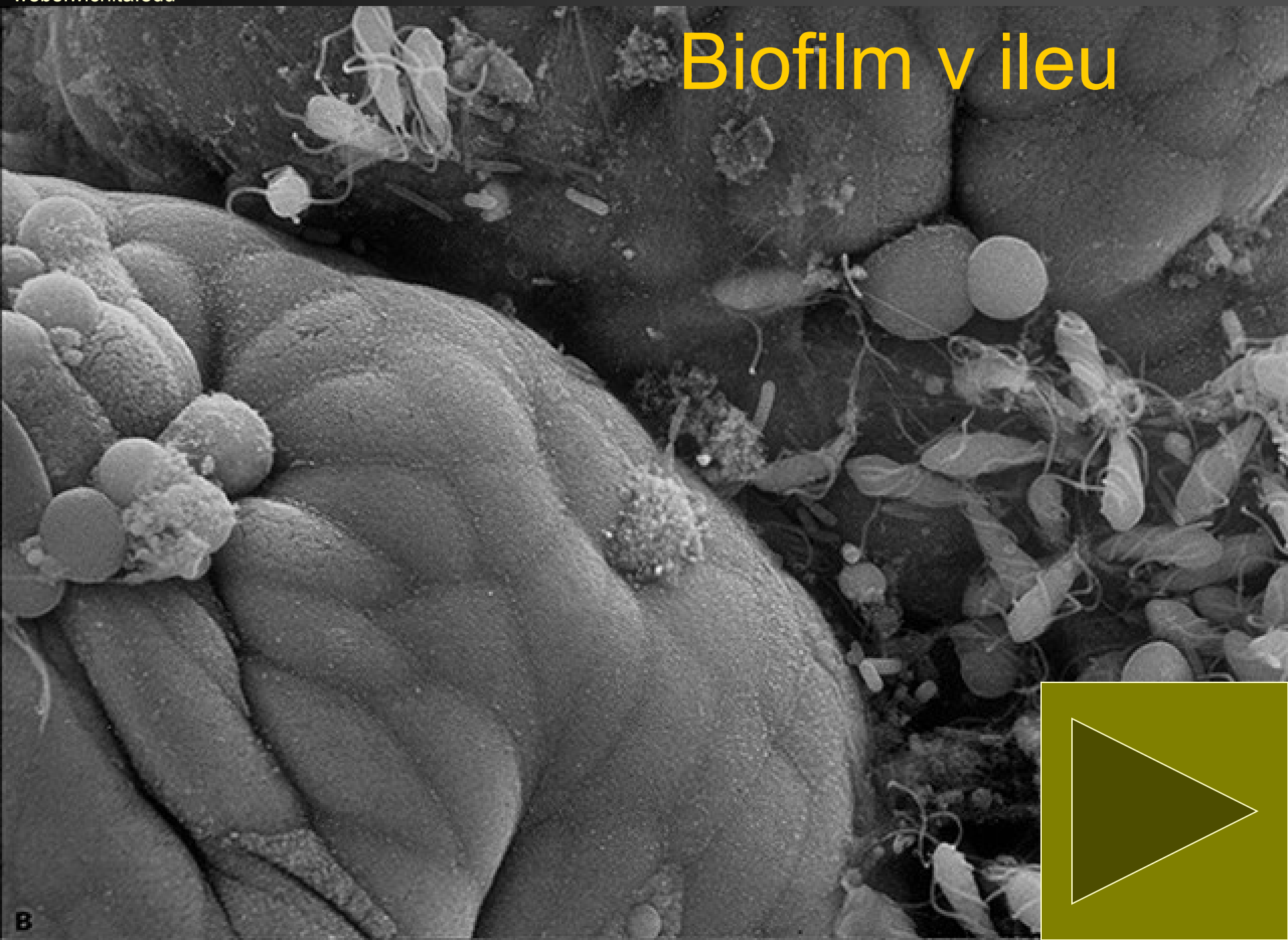


- Šanci pro prevenci dávají **materiálové vědy**, zejména makromolekulární chemie
- Povrchy nejsou stejně náchylné ke kolonizaci; méně náchylné jsou zpravidla hydrofobní povrchy. I jednotlivé plasty se liší
- V medicíně se již používají **materiály se speciální povrchovou úpravou**, případně dokonce napuštěné antibiotiky (to ovšem nelze v potravinářství připustit)



Další obrázky biofilmu

Biofilm v ileu

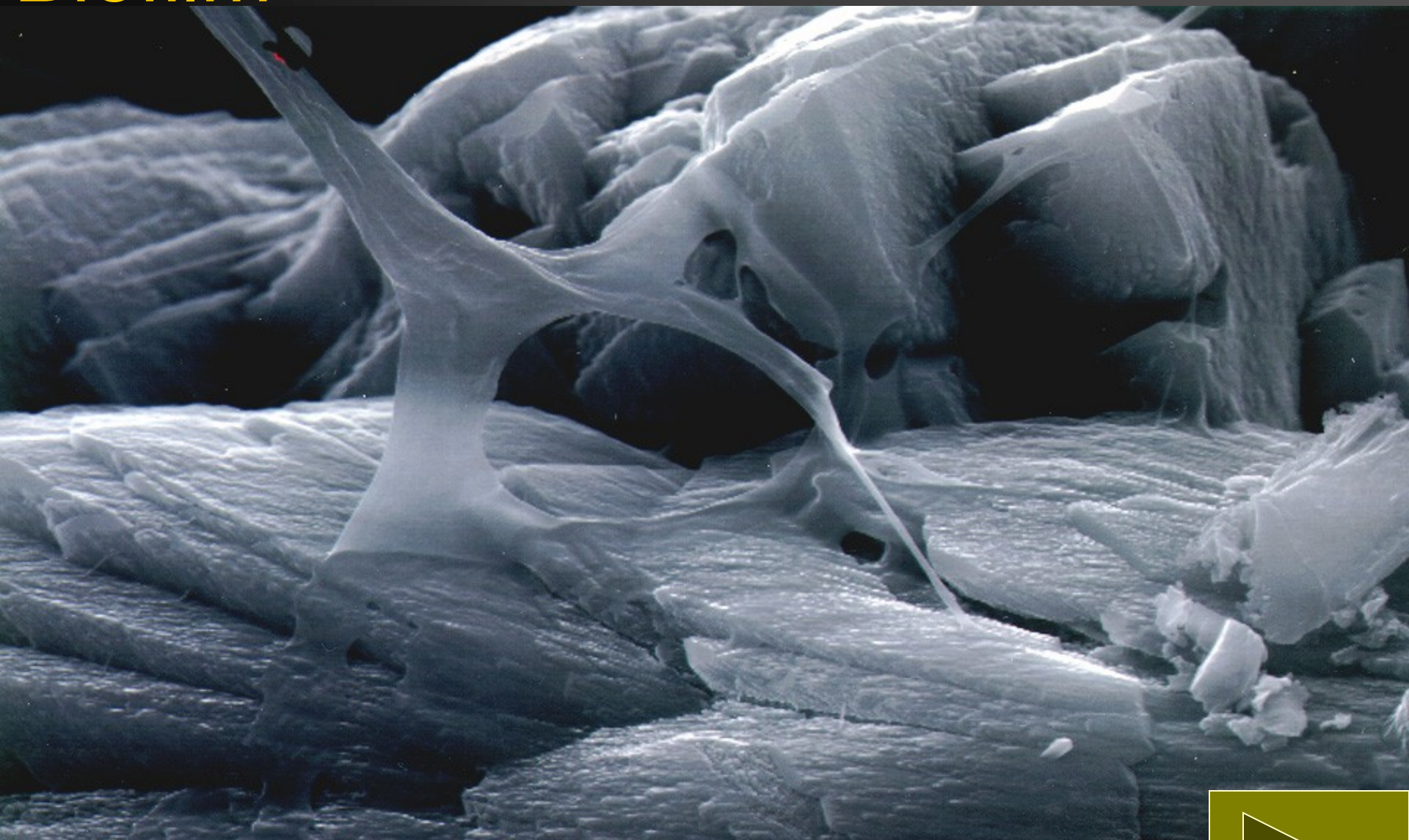


A Biofilm na protéze

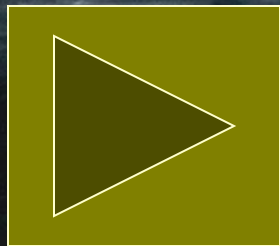
webs.wichita.edu



Biofilm



Acc.V - Exp |-----| 5 μ m
25.0 kV 5076 Travertine ZF#5 Unetched Area 2



B

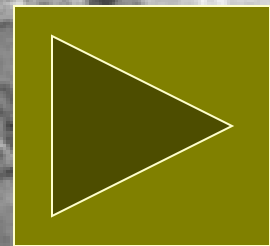
Yeast
|

Kvasinkový
biofilm

Matrix —

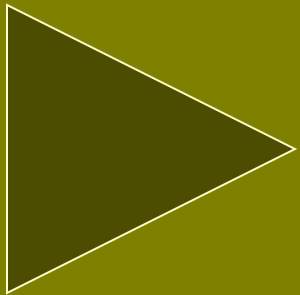
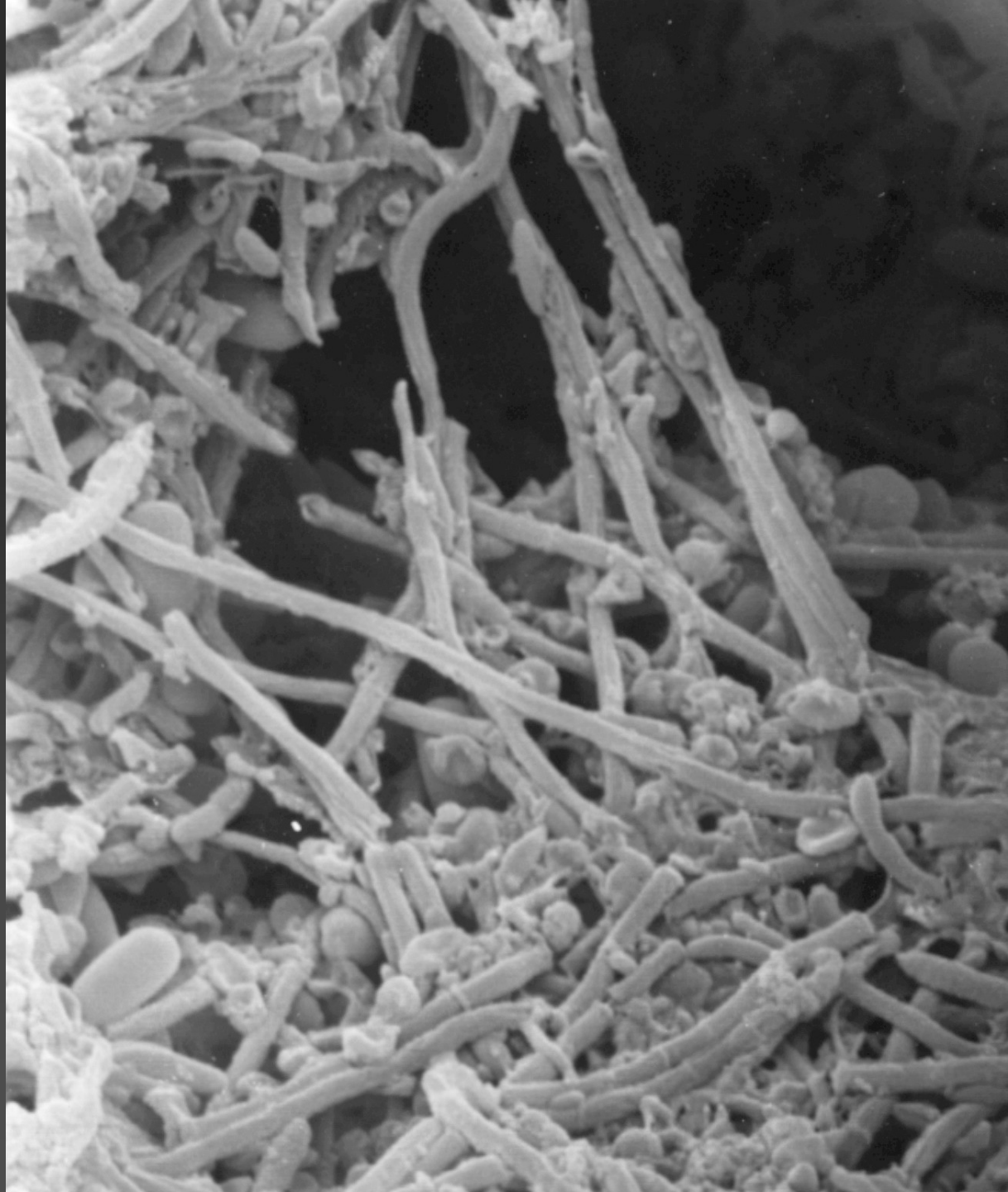
Hyphal
structure

30 μm

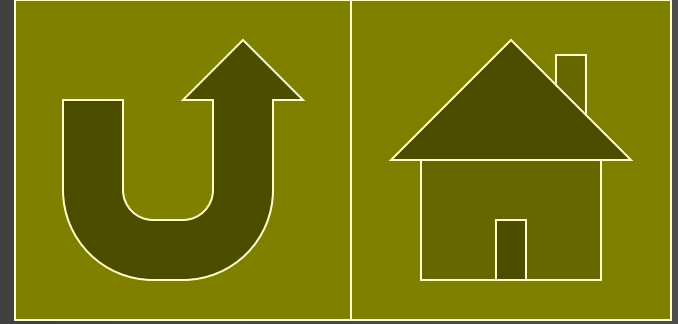


Biofilm

commtechlab.msu.edu



Shrnutí bonusového materiálu



- Biofilm působí komplikace **nejen ve zdravotnictví, ale i v jiných oborech**
- Nejčastějším dalším oborem, kde se biofilm uplatňuje, je **potravinářství**
- I zde ovšem existuje významná souvislost s lidským zdravím. Biofilm v technologických zařízeních se může stát **zdrojem kontaminace potravin, případně vody**