

Tvorba biofilmu u mikrobů izolovaných z klinického materiálu

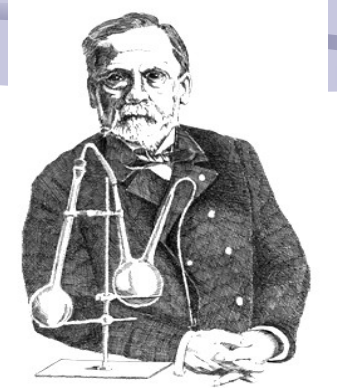


MUDr. Černohorská Lenka, Ph.D.

- Kdo **tvoří biofilm** (bakterie, viry, kvasinky, 1druh, více druhů, multibakteriální komunity)
- Kde se **tvoří biofilm** (většinou na pevných površích)
- Jak se **tvoří biofilm** (složitým mechanismem viz. dále)
- Proč se **tvoří biofilm** (ochrana před různými nepříznivými vlivy)



Kdo tvoří biofilm?



- *P. aeruginosa*
- *S. koagul. neg.*
- *K. pneumoniae*
- *E. coli*
- *S. aureus*
- *E. faecalis*
- *A. baumannii*
- *aj. (téměř všechny bakterie, kvasinky a plísně)*

Kde se tvoří?

- ☞ Katetry a cévky
- ☞ Kontaktní čočky
- ☞ Zubní implantáty
- ☞ Náhrady aj.
- ☞ Vodovodní trubky
- ☞ Na zubech – zubní plak, spolupodílí se na vzniku kazu v případě vysoké konzumace cukrů a nečištění zubů
- ☞ Na kamenech v řece - fyziologické na rozdíl od jiných!

Vznik biofilmu

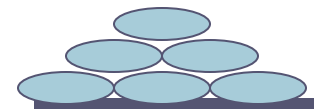
Na začátku je pevný povrch a plovoucí bakterie



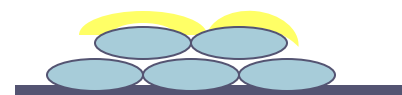
Bakterie adheruje na povrch



Následuje agregace dalších bakterií



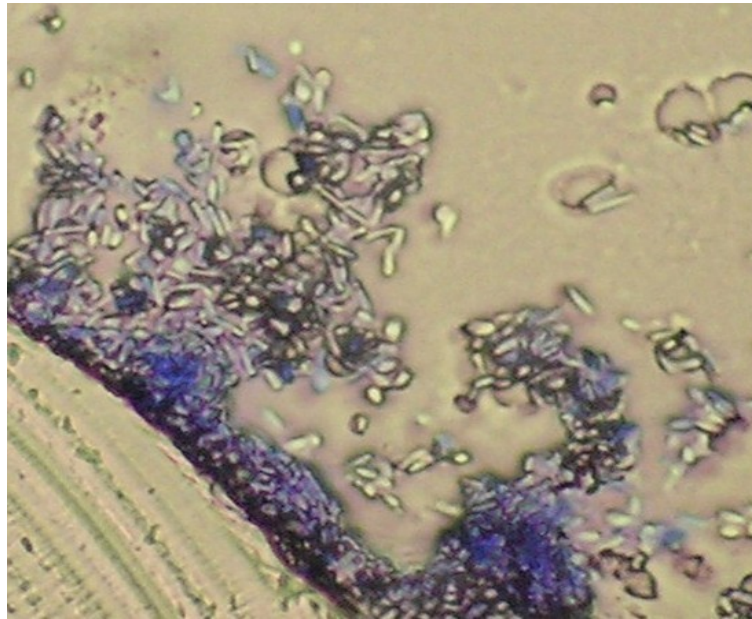
Bakterie začnou produkovat polysacharidovou matrix



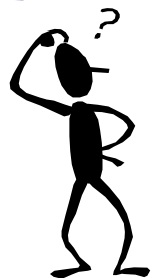
Až vznikne třídimenzióální struktura zvaná biofilm



Vznik biofilmu v časovém sledu



Pro zájemce na www.medmicro.info



Význam tvorby biofilmu u bakterií

**Tvorba biofilmu je spojována s virulencí!
Bakterie se stávají odolnější vůči:**

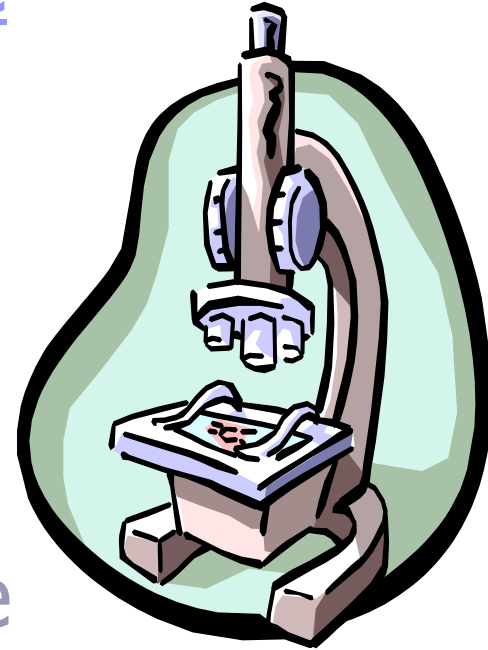
- ❖ antibiotikům
- ❖ imunitní reakci hostitele
- ❖ dezinfekčním prostředkům



Biofilm tvořící bakterie jsou původci až 65% nosokom. infekcí v USA

Mechanismy ovlivňující rezistenci na antibiotika

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



Průkaz biofilmu

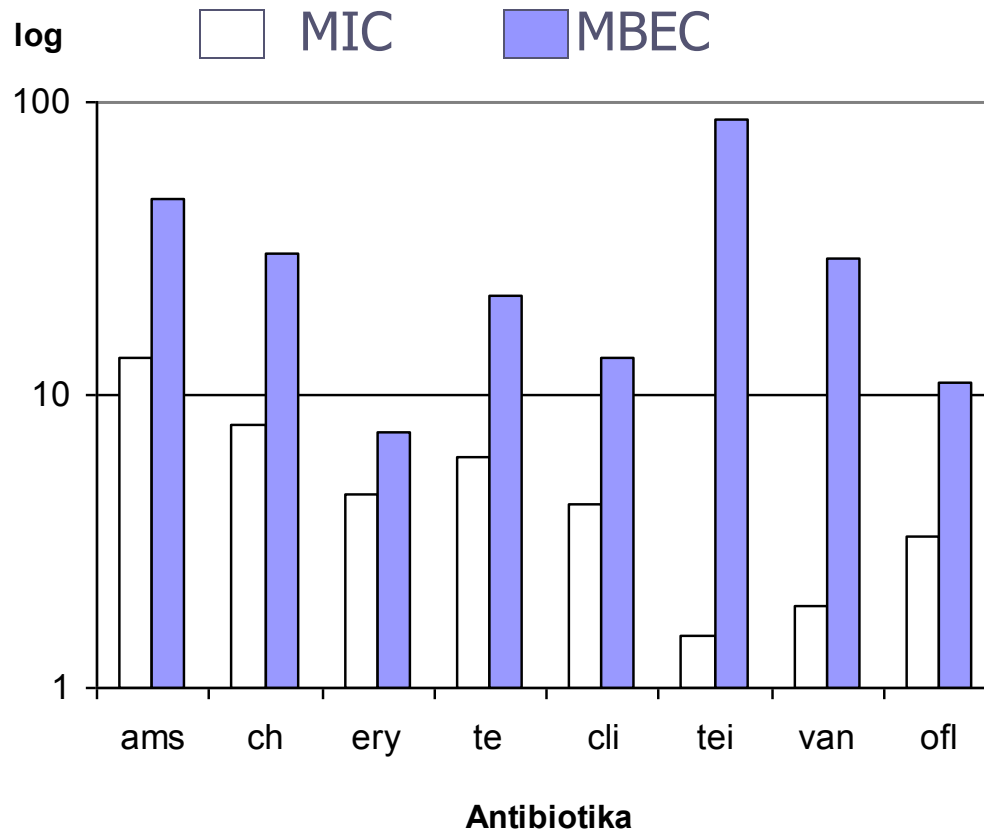


- ❖ **Ve zkumavkách či destičce dle Christensena¹**
kultivace mikroba, výplach planktonických bakterií + obarvení bakterií Inoucích ke stěně – modrá souvislá vrstva na stěně zkumavky nikoliv prstenec či sediment – to je biofilm!
- ❖ **Průkaz ve zkumavkách obarvených alciánovou modří**
- ❖ **Pomocí el. mikroskopie, SEM, TEM**
- ❖ **Speciálními kultivátory a jinými fenotypickými metodami**
- ❖ **Genotypovými metodami (PCR, FISH) aj.**

Stanovení citlivosti bakterií v biofilmu

- ❖ **Kultivace bakterií v "mikrotitrační" destičce v médiu**
- ❖ Po výplachu planktonických bakterií **přidáme** naředěné **antibiotikum (kombinace ATB)** a znovu kultivujeme
- ❖ **Stanovení MBEC** (minimum biofilm eradication concentration) – různé vědecké skupiny – různá označení - **ve srovnání** s **MIC** (minimum inhibitory concentration) mnohonásobně vyšší hodnoty (4x-1024x), **leží nad break pointem** daného antibiotika
- ❖ **K eradikaci nelze použít 1 ATB**, pokusy o stanovení synergismu 2 antibiotik, složitý vzorec, zatím jen pro výzkum
- ❖ Nutno znát **klinické souvislosti** (tj. stav pacienta)

Srovnání MIC a MBEC hodnot



Citlivost na ATB u kmene

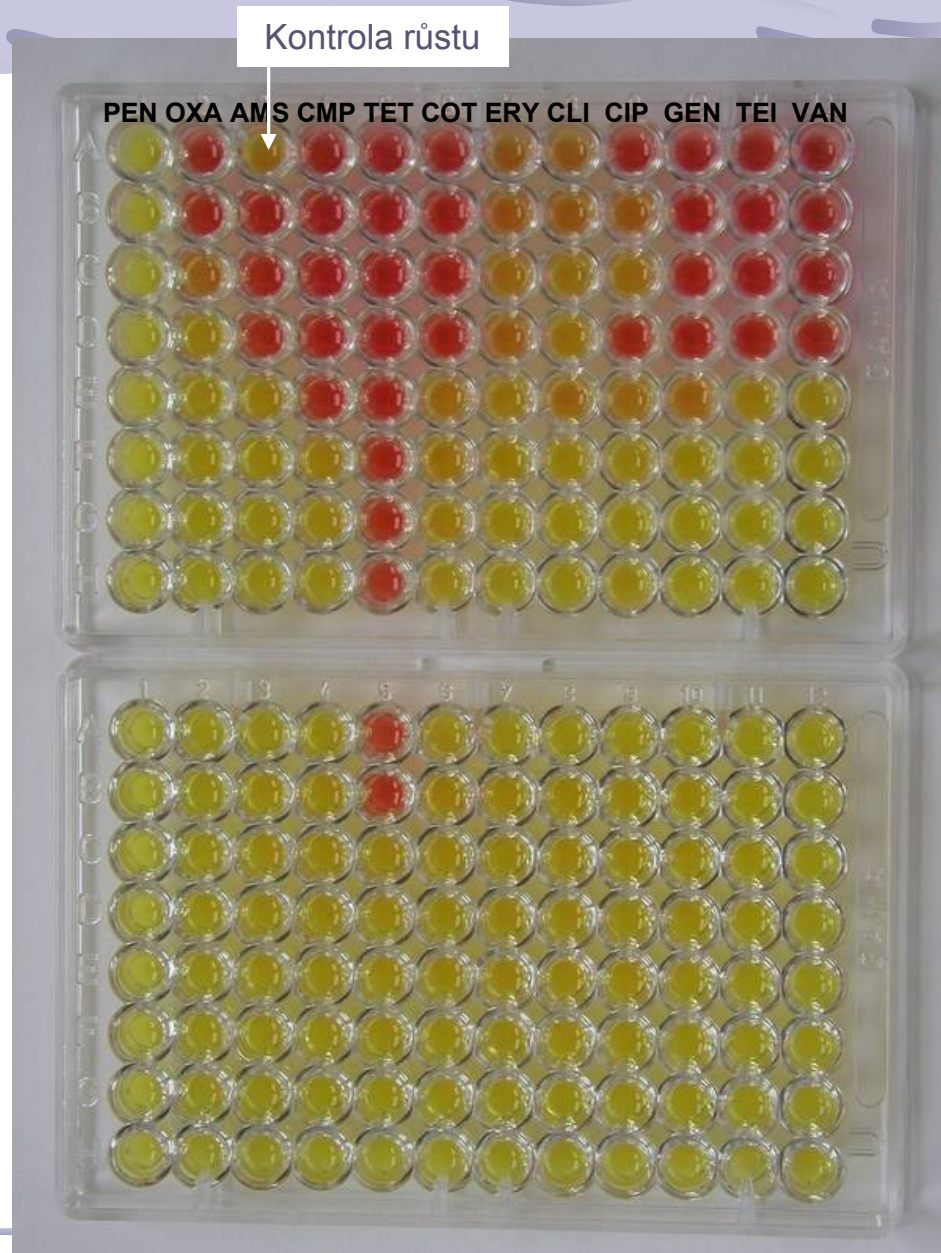
P. aeruginosa 320

320	MIC	MBEC
aztreonam	8*	128
ceftazidim	2*	32
cefoperazon	2*	64
cefepim	4*	64
netilmicin	0.25*	64
amikacin	0.5*	64
ofloxacin	0.125*	16
ciprofloxacin	0.125*	16

<i>P. aeruginosa</i> 320	$\sum \text{FBIC} \leq 0,5$ silný SE	$\sum \text{FBIC} > 0.5 \text{ a } \leq 1$ slabý SE	$\sum \text{FBIC} > 1 \text{ a } \leq 4$ indiference	$\sum \text{FBIC} > 4$ antagonismus
Testované kombinace antibiotik				
aztreonam + ciprofloxacin	0,02			
netilmicin + ofloxacin	0,08			
cefoperazon + ciprofloxacin	0,02			
aztreonam + cefepim		1		
ceftazidim + amikacin	0,13			
cefepim + amikacin	0,19			
ceftazidim + netilmicin	0,09			

* Bakterie MIC „citlivá“, MBIC 4x - 256x vyšší než MIC (mg/l)

Stanovení MBEC



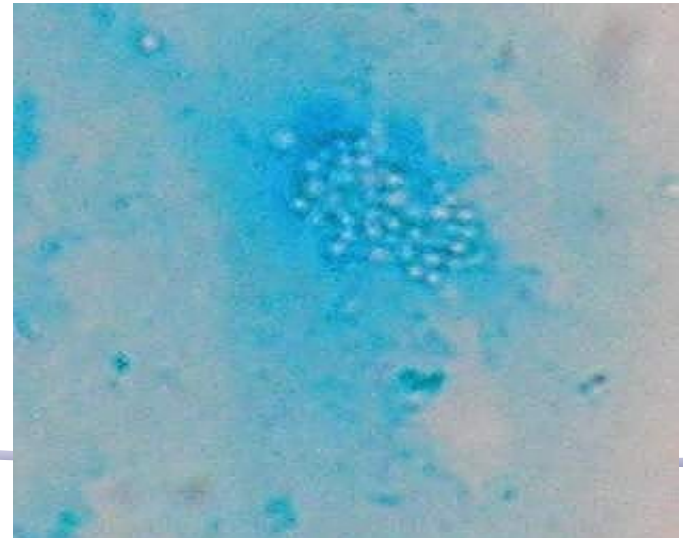
Doporučení a eradikace

- Stanovení MBEC je u bakterií tvořících biofilm vhodnější než stanovení MIC
- U pacientů nereagujících na léčbu stanovit synergy efekt, bakterie původně necitlivá na jednotlivá ATB je citlivá ke kombinaci ATB
- U mikrobů rezistentních i ke kombinacím antibiotik, zůstává jedinou možností vyjmutí biofilomového ložiska (katetrů, kloubních náhrad, zubních implantátů aj.)
- Možnosti prevence: katetry potážené antimikrobiál. substancemi např. minocyklinem a rifampicinem, proplachy, hygiena...



1 – Mikroskopie orálního biofilmu

- V preparátech barvených Gramem lze pozorovat shluky G + i G- bakterií a buňky makroorganismu (epitelie apod.)
- Jiná barvení, např. alciánovou modří znázorní polysacharidový materiál (nebuňěčné části biofilmu)



2 – Vliv čištění zubů na orální biofilm

Dobrovolník má připravenou tabletku s barvivem barvicím zubní plak. Nechte tabletku působit v dutině ústní cca 2 min. **Zakreslete, kde se nejvíce usazuje zubní plak**



3- Katetry

- **Klasická kultivace v bujonu:** Uvolní se bakterie v planktonické formě. *Bakterie ve formě biofilmu se neuvolní*
- **Semikvantitativní metoda:** Umožňuje zmapovat povrch katétru a semikvantitativně posoudit nález, *nevypovídá však o bakteriích v lumen*
- **Sonifikace:** rozrušuje biofilm na povrchu i v lumen katétru. Vyočkováním určitého objemu vzorku *lze posoudit množství* mikrobů

4 – Vliv přítomnosti sacharidů na tvorbu zubního plaku

- Posud'te vliv příjmu různého množství sacharidů ve stravě na rychlost tvorby biofilmu u kariogenního *Streptococcus mutans*

Jaké závěry vyplývají z tohoto pokusu ohledně množství sacharidů ve stravě, délce jejich setrvání v dutině ústní ?

5 – MIC versus MBEC



- MIC určuje *minimální inhibiční koncentraci* ATB u planktonické formy
- MBEC je *nejnižší koncentraci antibiotika, kde ještě prokážeme eradikaci biofilmu* (žádné živé buňky, pH beze změny - důlek zůstává červený). Vypovídá lépe o skutečném účinku antibiotika na bakterie žijící ve formě biofilmu