

# Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

**Týden 24:**

**Základy klinické mikrobiologie I (ekologie,  
biofilm, (mikroflóra jednotlivých částí těla)**

S využitím materiálů prof. Miroslava Votavy, ing. Veroniky Holé, Ondřeje Zahradníčka a dr. Lenky Černožorské



# Co nás dnes čeká

- Povídání o **vztazích mezi organismy**
- Rozvedení povídání o **biofilmu (o kterém už byly zmínky dříve)**
- Povídání o **normální mikroflóře jednotlivých částí těla**



# Mikro- ekologie

# Vztahy mezi organismy obecně

**Ekologie** je věda o vztazích mezi organismy navzájem a mezi organismy a prostředím

**Symbióza v širším slova smyslu** znamená jakékoli těsné soužití dvou rozdílných organismů

**Symbióza v užším smyslu** znamená pouze vzájemně prospěšné soužití obou organismů (také **mutualismus**, oba partneři mají ze soužití užitek a často nemohou mimo ně přežít, např. houba + řasa = lišejník)

Případ, kdy jeden organismus druhému škodí, se pak nazývá **antibióza** (a případná látka za ni zodpovědná je antibiotikum)

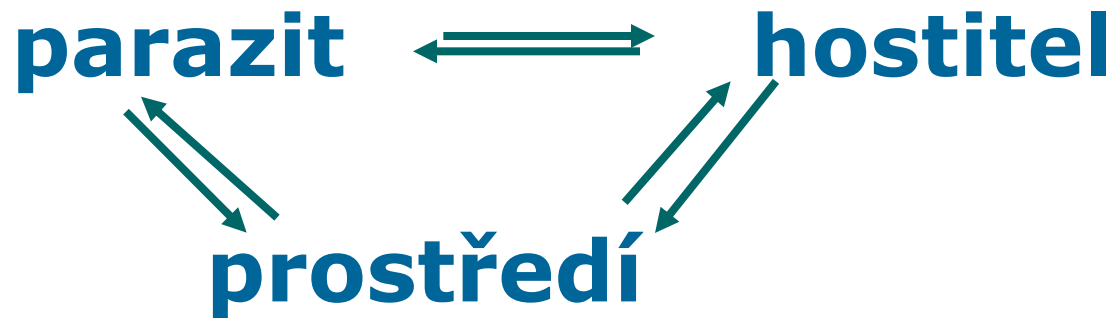
Vztah může být také **indiferentní**

# Potravní vztahy dvou organismů

- Komezalismus** – „sdílení jídelního stolu“ (mensa).  
Například potraviny, které sníme, využívají i mikroby našeho střeva
- Sapofytismus** – využívání odumřelých částí organismů či celých odumřelých organismů (odloupaných epitelii či celých mrtvých těl)
- Predace** – organismus se živí jiným živým organismem (lev – antilopa)
- Parazitismus** – případ, kdy jeden organismus žije na úkor druhého a napadá jeho živé buňky, ne však s cílem rychlého usmrcení (jako u predace), ale s cílem dlouhodobého přežití tímto způsobem (jmelí – stromy). **Sem patří i mnohé medicínsky významné mikroby.**

# Vztah parazit × hostitel

Je dynamický a je ovlivňován prostředím

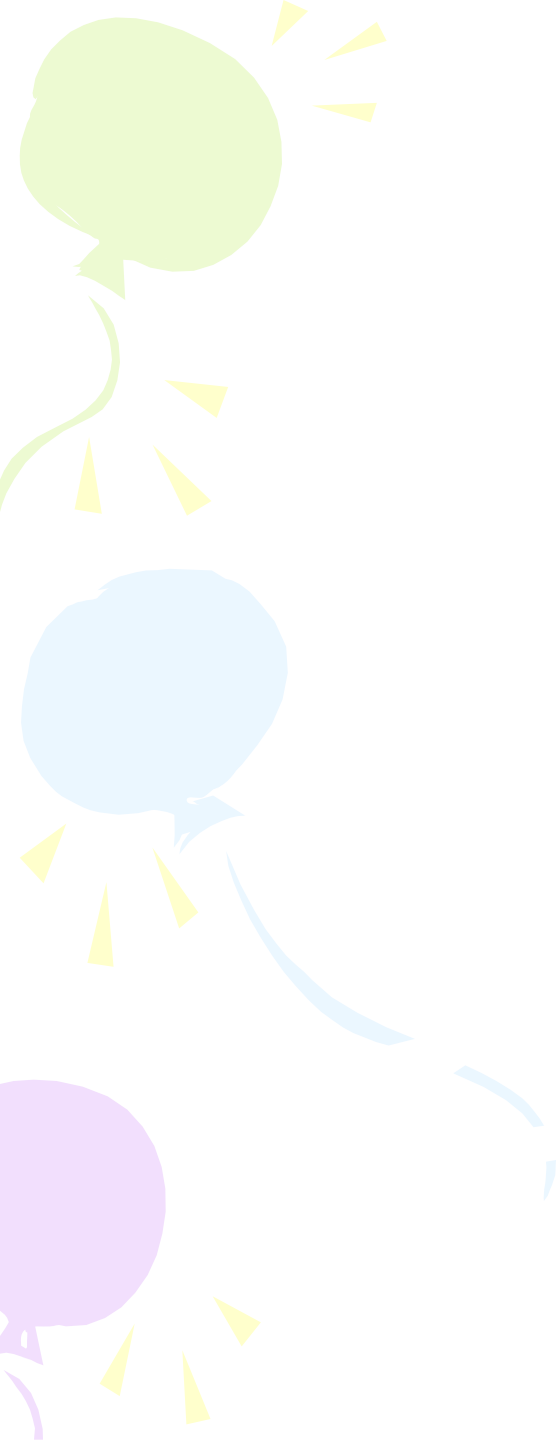


**Pro parazita** je zpravidla nejvýhodnější situace, kdy **hostitel přežije, ale nesnaží se parazita zbavit**

**Pro hostitele** je ale **živení parazita nevýhodné**, snaží se ho tedy zbavit – zničit, odstranit, nebo aspoň lokalizovat



Saprofyt: *Proteus* se podílí na likvidaci nestrávených bílkovinných zbytků potravy



# Biofilm



# Co je to biofilm

- Biofilm je **jeden ze způsobů života bakterií**. Je to způsob, kdy bakterie tvoří souvislou vrstvičku na určitém povrchu
- Opakem biofilmu je **planktonická forma života** bakterie
- **Biofilm** se v přírodě **vyskytuje velice často**. Biofilm je to, na čem v létě uklouzneme v rybníce, když šlápneme na kámen
- Biofilm může být **jednodruhový**, častěji však bývá **vícedruhový**
- Mohou se na něm podílet **bakterie, kvasinky, řasy a různé jiné mikroorganismy**

# Biofilm



# Biofilm: dobrý, nebo zlý?

- **Běžná mikroflóra se vyskytuje zpravidla více či méně ve formě biofilmu.** Takový biofilm je pro hostitele pozitivní a poskytuje mu ochranu před patogeny.
- Problém však je, pokud se ve formě biofilmu vyskytnou **patogenní mikroorganismy** a pokud dojde k narušení rovnováhy mezi mikroby a hostitelem.
- Závažný a nebezpečný bývá zejména **biofilm vzniklý na umělých površích** v organismu (katetry, implantáty a podobně)

# Píseň běžné flóry

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)*

# Vznik biofilmu

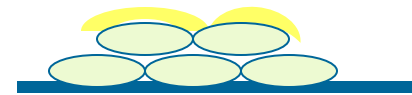
- Na začátku je **pevný povrch a plovoucí bakterie**



- Bakterie **adheruje** na povrch
- Následuje **agregace** dalších bakterií



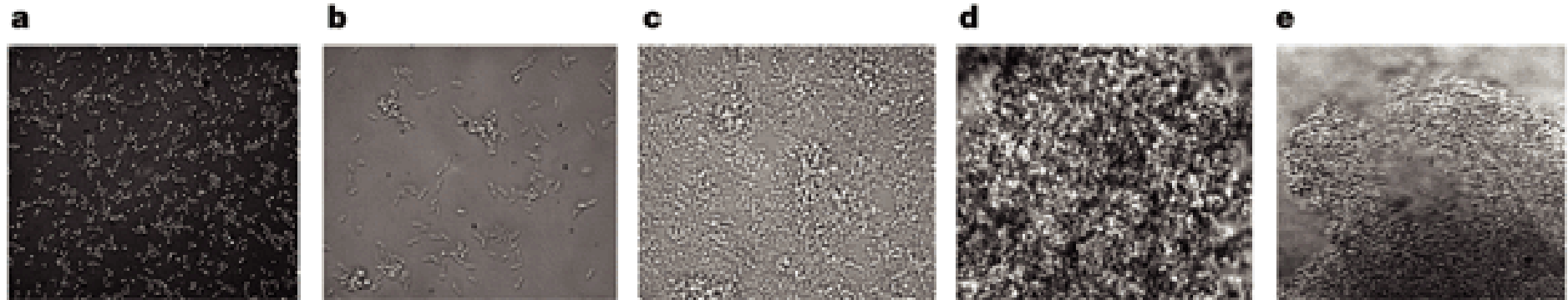
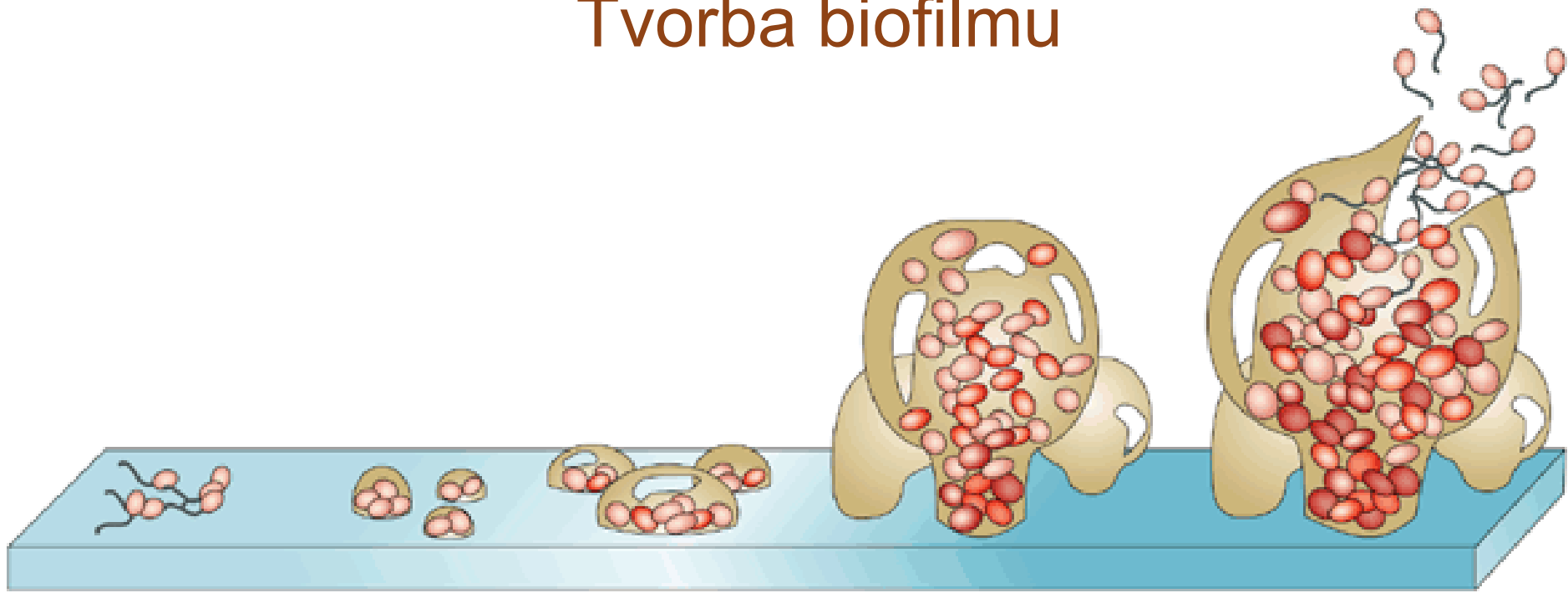
- Bakterie začnou produkovat **polysacharidovou matrix**



- Až vznikne **třídímenzionální struktura zvaná biofilm**



# Tvorba biofilmu



# 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:**

- **desinfekčním prostředkům**
- **antibiotikům**
- **imunitní reakci hostitele**

*Biofilm tvoří jak bakterie běžné flóry (z hlediska organismu spíše pozitivní), tak i patogeny.*

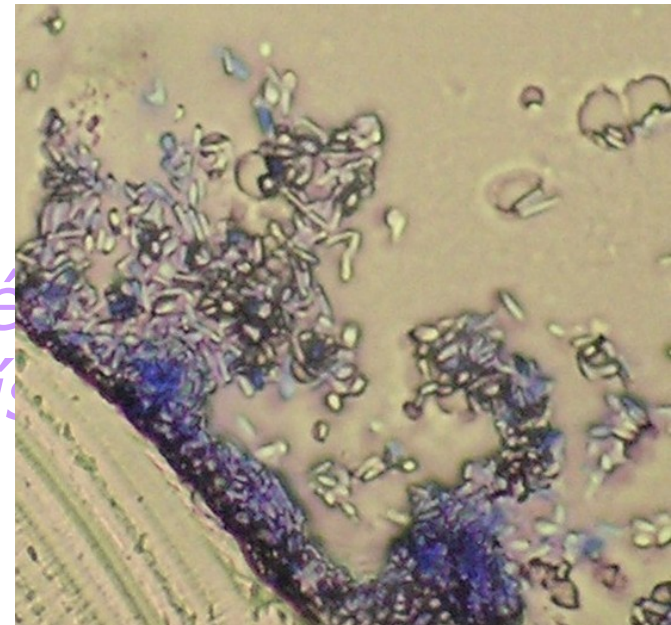


Foto: Archiv Veroniky Holé

# Klinický význam biofilmu

- **kolonizace a infekce cizorodých materiálů**  
(kanyly, kloubní náhrady a pod.)
- velmi obtížná eradikace infekce – nutnost radikálních řešení (odstranění implantátu)
- neúčinná ATB terapie (1000x vyšší rezistence)
- selekce rezistentních kmenů (horizontální i vertikální přenos genů)



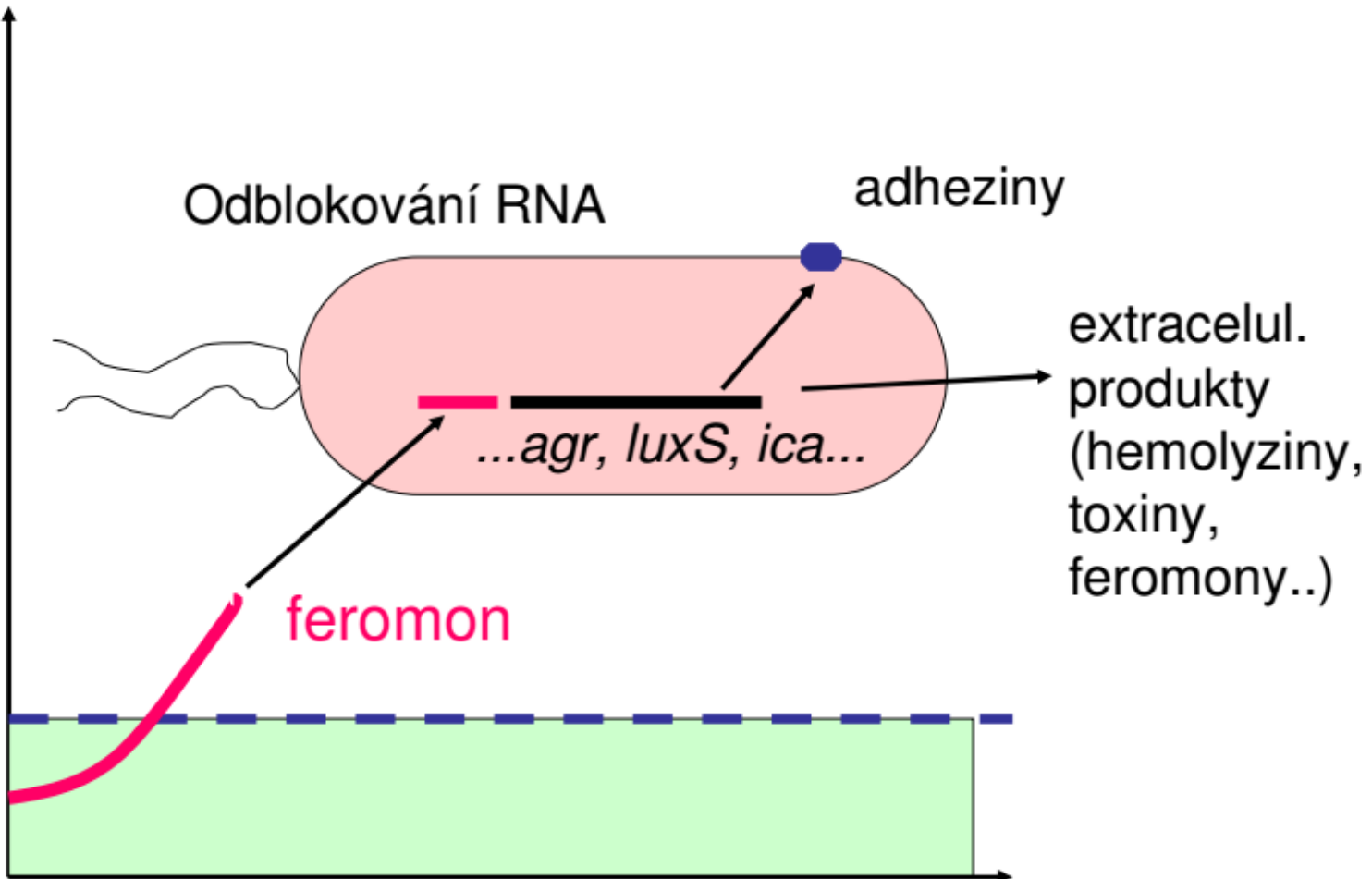
# Quorum sensing systémy

- **Quorum** = nejmenší nutný počet hlasů (v parlamentu)
- QS je systém **komunikace mezi bakteriemi**, který kontroluje expresi mnoha genů v závislosti na denzitě populace.
- Využívá **malých signálních molekul** zvaných autoinduktory (feromony).
- Jestliže se nahromadí do prahové koncentrace, přímo či nepřímó kontrolují transkripci cílových genů.

# Význam QS systémů a biofilmu

- regulace růstu bakterií
- prokázána mezidruhová regulace stafylokoky x G-tyčky
- **podstatně rychlejší horizontální přenos genetické informace**
- intercelulární komunikace - sociálně evoluční teorie pro mikroorganismy - sociomikrobiologie

# Funkce QS



# Patologický biofilm – příběh

- 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 vyšetření přes jícen **nález vegetace na komorové elektrodě** o velikosti  $1,5 \times 1,5$  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**.

# Předpokládané mechanismy ovlivňující rezistenci k antibiotikům (stále se zkoumá)

- **Vliv povrchového náboje**
- **Snížení růstové rychlosti**
- **Horší prostupnost antibiotika**
- **Nehomogenní matrix**
- **Fenotypové odlišnosti**
- **Intercelulární signalizace**
- **Imunitní mechanismy**

# Biofilm a antibiotika

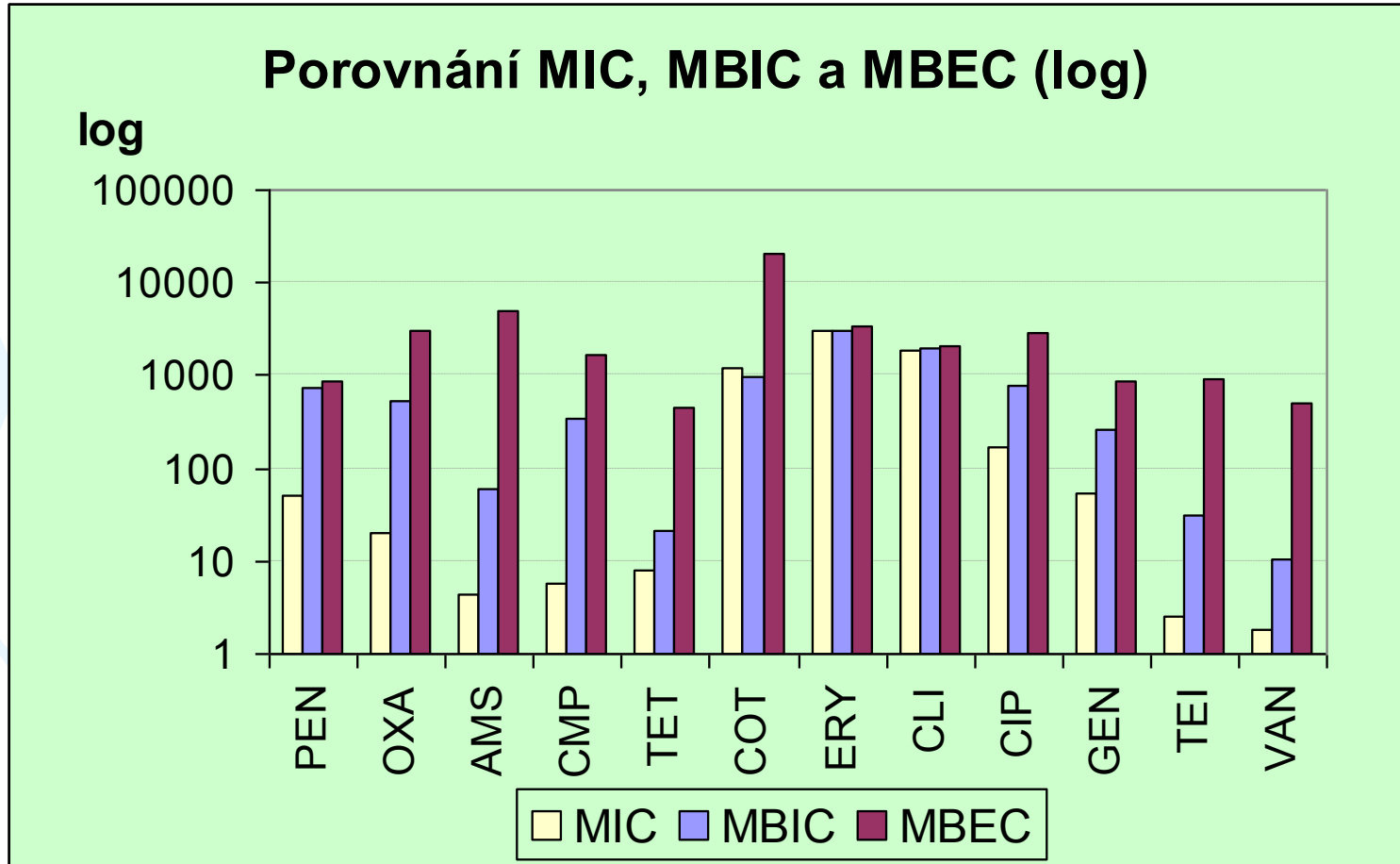
- Pokud jsou bakterie ve formě biofilmu, **nemusí antibiotika „zabrat“**, i když klasické metody in vitro citlivosti dávají léčbě šanci.
- V takovýchto případech **není vypovídající hodnota MIC či MBC, ale hodnoty MBIC** (minimální biofilm inhibující koncentrace) **a MBEC** (minimální biofilm eradikující koncentrace)



# Biofilm a antibiotika – pokračování

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

# Rozdíly v MIC, MBIC a MBEC – porovnání



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

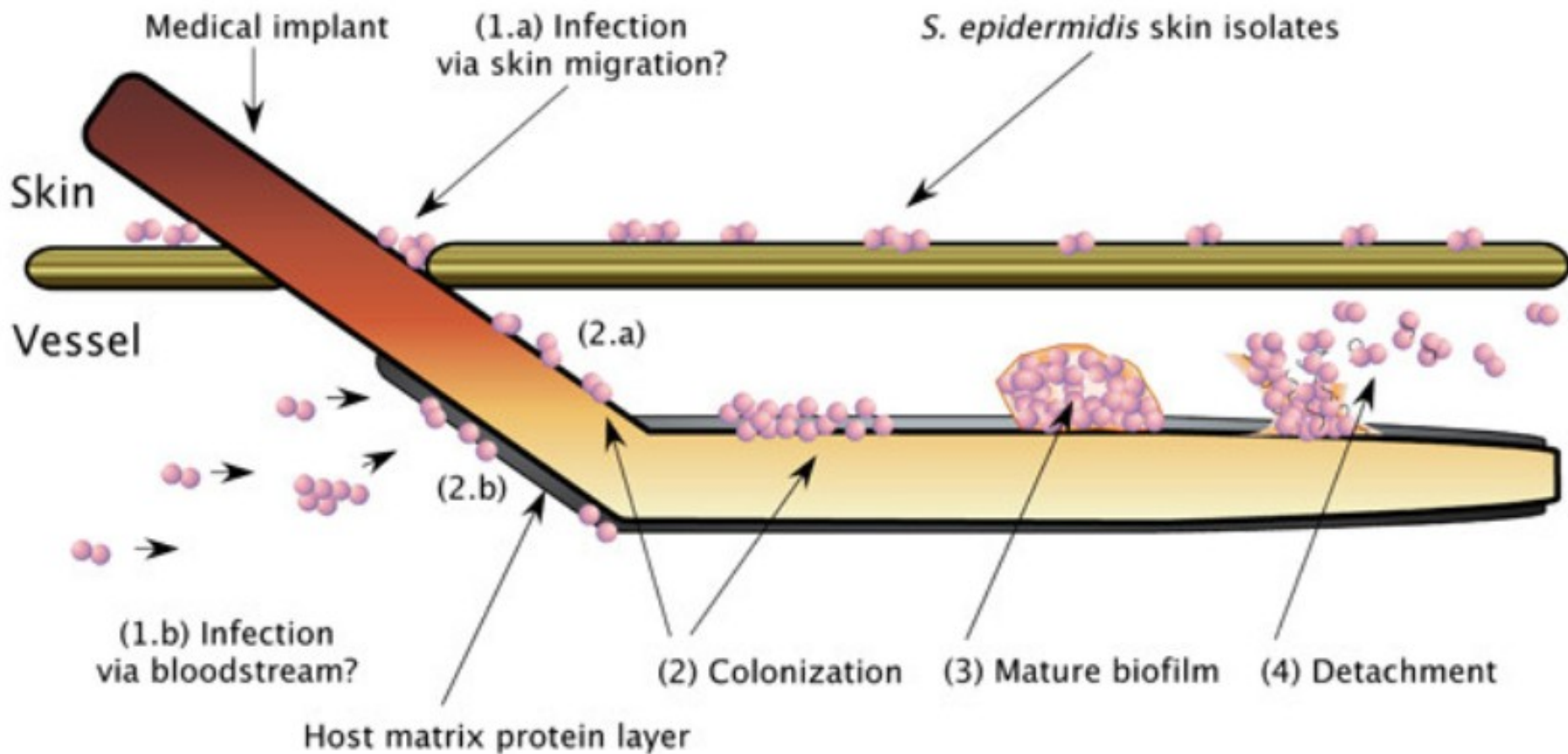
# Biofilm a mikrobiologická diagnostika

- Protože dnes víme, že biofilm existuje a je důležitý, nemůžeme se tvářit, že tomu tak není. **Biofilm ovlivňuje mikrobiologickou diagnostiku v následujících bodech:**
  - Pokud předpokládáme tvorbu biofilmu, je třeba to zohlednit při **zpracování materiálu** (např. u katetrů)
  - Je možné přímo **detekovat tvorbu biofilmu**, resp. sklon bakterií tvořit biofilm
  - Je možné (a užitečné) **určovat hodnoty MBIC a MBEC.**

# Kultivace bakterií tvořících biofilm

- **Pokud bakterie tvoří biofilm, je vhodné zohlednit tuto skutečnost při zpracování materiálu**
- V poslední době se vedou velké diskuse např. o tom, jak zpracovávat **žilní katetry** před jejich kultivací v mikrobiologické laboratoři.
- Jsou vyvíjeny metody, jejichž cílem je dobrý záchyt patogenů, jejich kvantifikace a zároveň odclonění kontaminace

# Model infekce cévního katetru



# Klasické zpracování katetrů

- **Klasická kultivace v bujonu:** katetr se vloží do tekuté půdy a kultivuje 24 h. Je-li po této době bujon zakalený, je vyočkován na pevnou půdu a případné bakterie identifikovány.
- **Co se stane:** 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).

# Nové možnosti zpracování katetrů

- **Semikvantitativní metoda:** Bujon se oválí po povrchu pevné půdy. **Co se stane:** zmapujeme povrch katétru a semikvantitativně posoudit nález, nevypovídá však o bakteriích uvnitř a bakterie se nemusí uvolnit z biofilmu.
- **Sonifikace:** biofilm rozbijeme ultrazvukem. **Co se stane:** rozrušíme biofilm na povrchu i uvnitř katétru. Vyočkování určitého objemu vzorku je kvantitativní metoda, takže dává možnost posoudit množství mikrobů.

# Možnosti detekce produkce biofilmu u bakterií a kvasinek

- Průkaz biofilmu **fenotypovými metodami** (kultivace na agaru s kongo červení, Christensenova metoda)



- Průkaz biofilmu **genotypovými metodami**

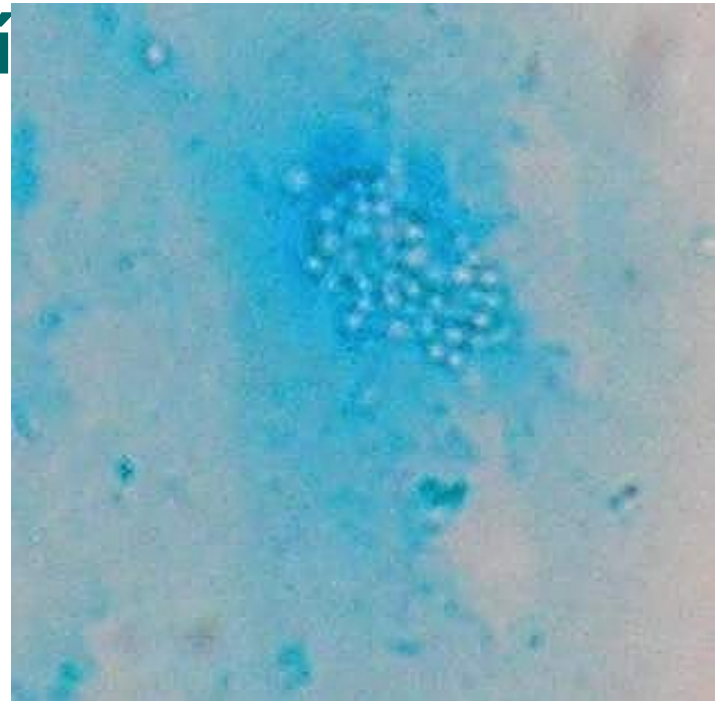
Photo:



# Spíše pro výzkumné a výukové účely: Mikroskopie orálního biofilmu

- **V preparátech barvených Gramem** lze pozorovat shluky bakterií (G+ i G- ) a případně buňky makroorganismu (epitelie apod.)
- **Jiná barvení, např. barvení modří**

umožňují i znázornění polysacharidového materiálu, tj. nebuněčné části biofilmu, buňky jsou zde znázorněny negativním barvením



# Jak zjistit biofilm na zubní sklovině

- Dobrovolník má připravenou tabletku s barvivem barvicím zubní plak.



- Tabletka se nechá působit v dutině ústní cca 2 min. Poté je vidět, kde se nejvíce usazuje plak



# Stanovení MBIC a MBEC

- Používá se podobných destiček jako při určování MIC, avšak speciální metodika umožní určení hodnoty MBIC či MBEC.



Foto: Archiv Veroniky Holé

# Léčba: Eradikace biofilmu

- **Antibiotická léčba často potlačí pouze příznaky** 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**

# Prevence

- Prevence nadměrného **biofilmu v ústní dutině**
  - Pravidelné čištění zubů a omezení sladkých jídel a nápojů
- Prevence **katetrových biofilmů**
  - Katétry a kostní cementy z materiálů nepodporujících tvorbu biofilmu, případně s **antimikrobiálními substancemi**, např. minocyklin či rifampicin
  - **Proplachy katétrů**
  - **Dodržování pravidel asepse**, správné dekontaminační postupy apod.

A decorative graphic on the left side of the slide features three balloons in light green, light blue, and light purple. Each balloon is attached to a thin, wavy string and has several small, yellow, triangular shapes radiating from its bottom, resembling light or confetti. The balloons are arranged vertically, with the green one at the top, the blue one in the middle, and the purple one at the bottom.

# Běžná flóra

# Normální mikroflóra a její význam

- Na různých místech lidského těla je přítomna tzv. **normální (běžná) flóra či mikroflóra.**
- Je tvořena **komenzálními či saprofytickými mikroby**, které jsou hostiteli více či méně prospěšné:
  - kolonizací příslušné sliznice **brání tomu, aby byla osídlena patogeny**
  - podílejí se na **stavu mikroprostředí**, např. pH
  - ve střevě **likvidují nestravitelné zbytky**
  - mohou mít i **další pozitivní efekty** pro hostitele (např. tvorba vitamínů střevními bakteriemi)

# Kde mikroflóra je a kde není

- **Mikroflóra není** ve tkáních, v parenchymu orgánů, v krvi, v mozku ani mozkomíšním moku. Zde je každý nalezený mikrob velmi pravděpodobně patogenem
- **Mikroflóra není** ani v některých dutých orgánech, např. v jícnu, v plicích, v močovém měchýři (kromě starých osob) či v děloze
- **Mikroflóra je** zejména v dutině ústní a hltanu, v tlustém (a zčásti i tenkém) střevě, v pochvě a v menším množství také na kůži



# Mikroflóra v průběhu života člověka

- **Plod nemá žádnou běžnou flóru**, po narození zvolna začíná osidlování
- Během prvních měsíců a let života se **běžná mikroflóra vyvíjí** (zejména střevní v souvislosti se změnami potravy)
- **U žen** se mění vaginální mikroflóra v důsledku hormonů při **menarche**, dále při **začátku pohlavního života** a pak v **menopauze**
- **U starších osob** dochází k dalším změnám (např. se často ustanoví „běžná flóra“ v močovém měchýři, dříve sterilním)

# Mikroflóra jako ekosystém

- Kdysi lidé mysleli, že všechny škůdce úrody jednoduše zahubí například DDT. Ukázalo se ale, že takový **brutální zásah často nadělá víc škody než užitku**, zvláště když se použije nevhodným způsobem
- Podobně **složitý ekosystém je i třeba střevní mikroflóra**. I proto dnes na střevní infekce většinou nedoporučujeme antibiotika, protože systém „rozhodí“ často ještě víc.

# Přehled běžné mikroflóry

Kůže, nos, boltec, zevní zvukovod, kožní adnexa	Stafylokoky (i zlaté), korynebakteria, kvasinky
Hltan a ústní dutina	Ústní streptokoky a neisserie Hemofily, malá množství pneumokoků, meningokoků, anaeroby, nepat. treponem.
Tlusté (i tenké) střevo	Anaeroby, enterobakterie, enterokoky, <i>Entamoeba coli</i>
Vagina	Laktobacily, malá množství nejrůznějších mikrobů
Přechody (rty apod.)	Směs zástupců obou míst

# Normální osídlení dýchacích cest

- **Nosní dutina** nemá specifickou flóru, přechází tam však mikroflóra z kůže (přední část) a hltanu (zadní část)
- **V hltanu** (stejně jako v ústní dutině) nacházíme ústní streptokoky, neisserie, nevirulentní kmeny hemofilů aj. Mnohé další tam jsou, ale většinou je nevykultivujeme
- **Plíce a dolní dýchací cesty** jsou normálně bez většího množství mikrobů
- **Na ostatních místech** (hrtan) jsou různé přechody (hrtan – jako v hltanu, ale méně)

# Normální osídlení trávicích cest

- **Rty** znamenají přechod kožní a ústní flóry
- **V ústní dutině** (stejně jako v hltanu) nacházíme ústní streptokoky, neisserie, nevirulentní kmeny hemofilů aj. Mnohé další tam jsou, ale většinou je nevykultivujeme
- **Jícen a žaludek** jsou za normálních okolností bez většího množství mikrobů
- **V tenkém a zejména tlustém střevě** nacházíme zpravidla asi 1 kg anaerobů, dále enterobakterie, enterokoky, kvasinky, někdy i nepatogenní améby
- **Řiť** je opět místem přechodu střeva a kůže

# Normální situace v ústní dutině

- Ústní dutina je i za normální situace velice **složitý ekosystém**, složený z různých druhů bakterií, usazených materiálů, lidských buněk a dalších složek
- Bakterie se v dutině ústní přitom nevyskytují v nějakém chaosu, ale v komplikovaném, **strukturovaném útvaru, zvaném biofilm**. V daném případě jde o vícedruhový strukturovaný biofilm, ve kterém např. anaeroby jsou přítomny ve větší hloubce než aerobní bakterie

# Močové cesty zdravého člověka

**Ledviny** – normálně bez mikrobů

**Pánvičky ledvinné** – normálně bez mikrobů

**Močovody (uretery)** – normálně bez mikrobů

**Močový měchýř mladých a středně starých osob** – normálně bez mikrobů

**Močový měchýř seniorů** – i za normálních okolností může být osídlen mikroflórou, která nečiní problémy a stává se „běžnou flórou“

**Močová trubice** – normálně bez mikrobů, část přilehlá k ústí však může být osídlena zvenčí

# Normální stav pohlavních orgánů

- Za normálních poměrů nejsou mikroby
  - **U ženy** v děloze, vejcovodech, vaječnicích
  - **U muže** v prostatě, chámovodech, varlatech
- Specifickou normální flóru má **vagina** (laktobacily, příměs různých aerobních i anaerobních mikrobů)
- **Vulva** tvoří přechod vaginální a kožní flóry
- U muže je specifický **předkožkový vak**, vedle kožní flóry jsou tu i např. nepatogenní mykobakteria apod.



# Normální osídlení kůže

- Přestože kůže je pro mikroby nejdostupnější, je její **osídlení mnohem chudší** než v případě např. úst, pochvy či tlustého střeva
- Mikrob, který chce žít na kůži, musí snášet **vyschnutí a vysoké koncentrace solí**
- **Na kůži se tedy normálně vyskytují**
  - koaguláza negativní druhy stafylokoků
  - **zlatý stafylokok** – malé množství je normální
  - **korynebakteria** a příbuzné G+ tyčinky
  - malá množství **kvasinek**

# Péče o střevní mikroflóru

- V **rekonvalescenci průjmů**, ale i např. **po celkové antimikrobiální terapii** (kde mohlo dojít k vybití části mikroflóry) je vhodné snažit se o **obnovu normálního stavu**
- Používají se **jogurty** (nesladké, netučné), **kyselé zelí**, různé preparáty (Hylac)
  - Některé obsahují substráty pro „dobré“ bakterie, to jsou **prebiotika**.
  - Některé obsahují přímo ty dobré bakterie, to jsou **probiotika**
  - Některé obsahují oboje, to jsou **symbiotika**



# Biofilmová probiotika

- jsou kultivovaná na nosičích podporujících tvorbu biofilmu
- svou strukturou jsou „naprogramovaná“ k rychlému přilnutí ke střevní sliznici
- vyšší odolnost proti kyselému pH v žaludku
- antibiotika ale ničí i běžné, volné probiotické bakterie
- lépe vzdorují působení antibiotik

# Péče o vaginální mikroflóru

- Také **vaginální ekosystém může být narušen** antimikrobiální léčbou či nějakým onemocněním
- Také zde doporučují „lidové receptury“ např. aplikaci jogurtu do pochvy
- Jinak lze doporučit **prebiotické či probiotické vaginální čípky**
- Důležitá je také **výživa a úprava hormonálních hladin** (antikoncepce)



Děkuji za pozornost