



Bakterier i Biofilm

- ny revolutionerende indsigt

Bo Jørgensen
2009

Videncenter for Sårheling
BBH



Bakteriel biofilm – en definition:

- *Biofilm er en struktureret ansamling af bakterier, inhyllet i selvproduceret matrix*
- *Biofilm er resistent for antibiotika, desinfektiva og fagocytose.*
- *Bestående fremmedlegeme-infektion er forårsaget af biofilm*

Nils Højby et al, Ugeskr. Læger, 2007 nov 26 169(48):4163-6

- *Bestående sårinfektion kan være forårsaget af biofilm*



- Kroniske sår: 60% med biofilm
- Akutte sår: 6% med biofilm
- Konklusion: **Kronisitet korreleret til biofilm?**

Biofilm in chronic wounds *Garth James et al, Wound rep reg 2008 16 (37-44)*

Biofilm I sår

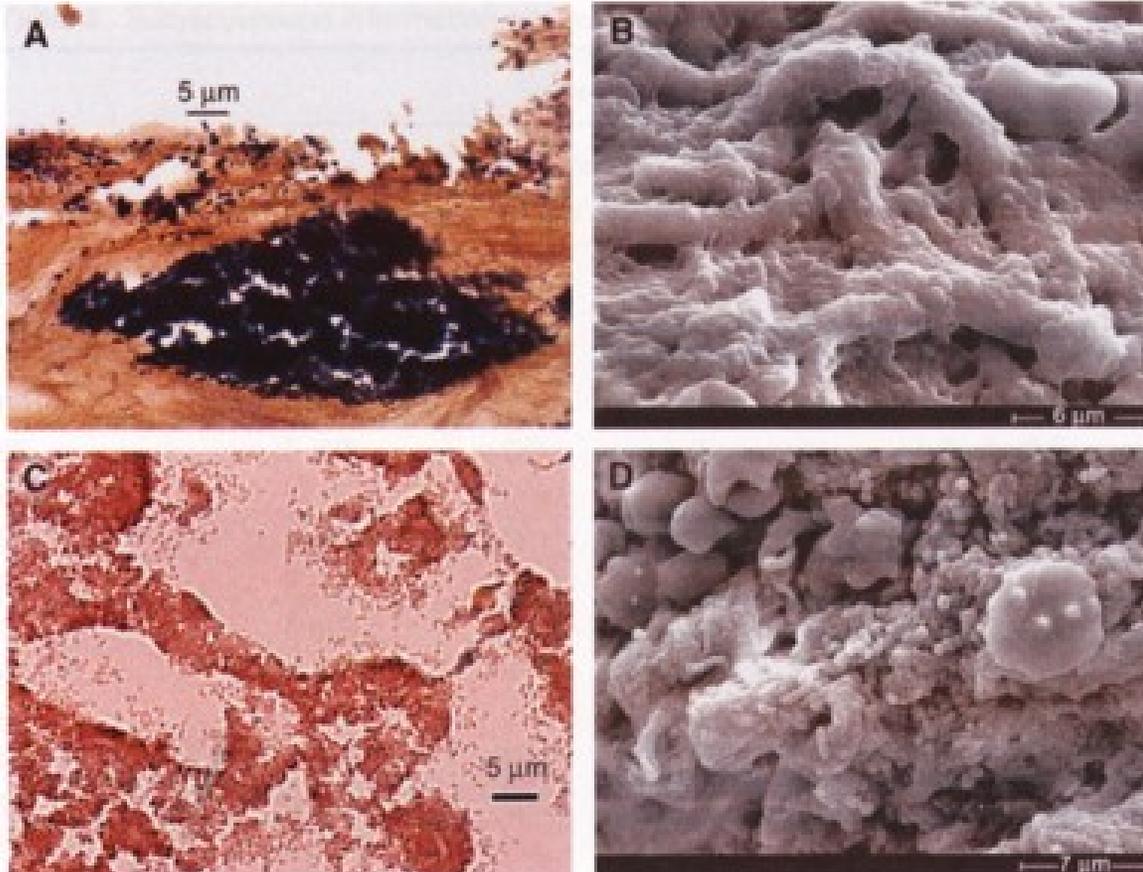
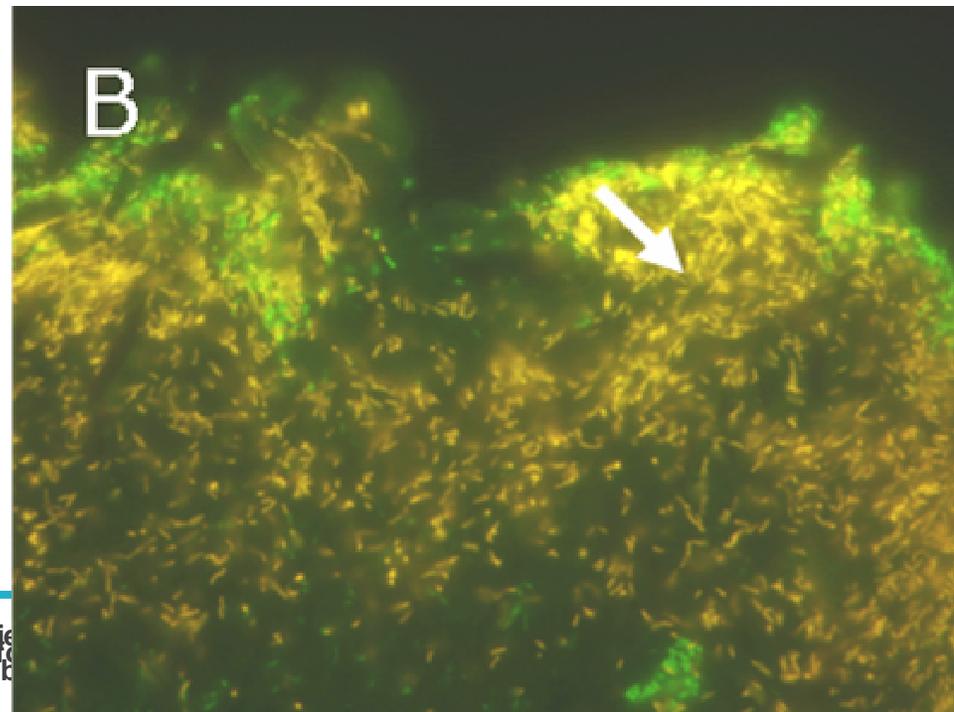
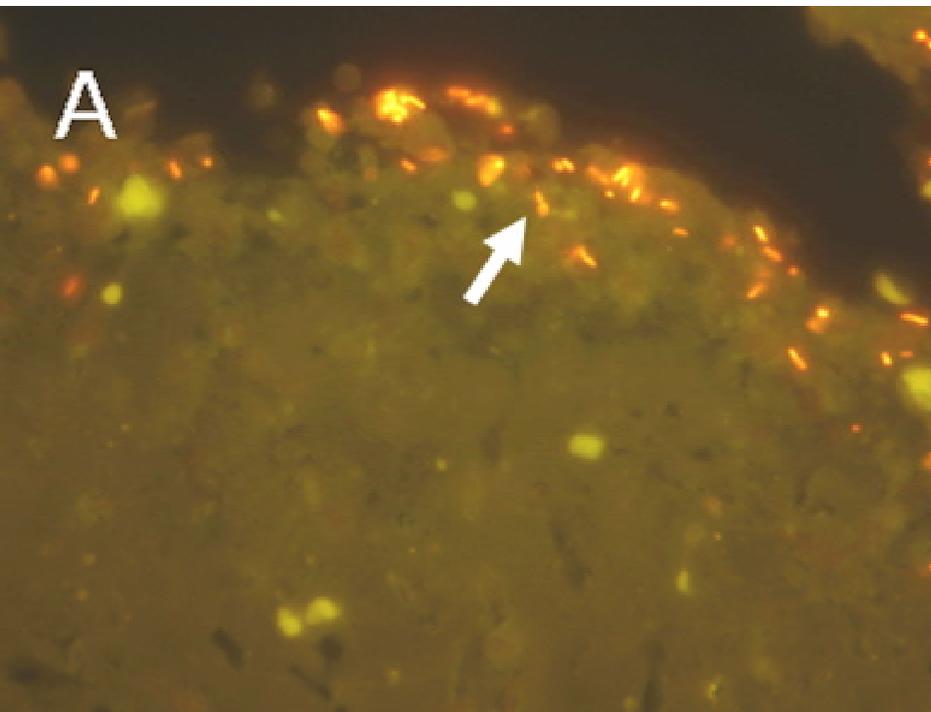


Figure 1. Microscopic images from chronic wounds. (A) Photomicrograph of a Gram-stained thin section from a pressure ulcer specimen showing a biofilm formed by Gram-positive cocci near the tissue surface. Gram-positive cocci were commonly observed in samples examined using light microscopy, which agreed with culture analysis that revealed the predominance of *Staphylococcus* and *Enterococcus*. (B) Scanning electron micrograph of pressure ulcer specimen showing a biofilm of coccoid bacterial cells colonizing collagen bundles within the wound. The bacterial cells are blanketed in extracellular polymeric substance, which had collapsed onto the cells during the dehydration steps of specimen preparation. (C) Photomicrograph of a Gram-stained thin section from a diabetic foot ulcer specimen showing a biofilm formed by Gram-negative rods near the tissue surface. (D) Scanning electron micrograph of pressure ulcer specimen showing bacteria of different morphotypes (rods and cocci) colonizing the wound within close proximity.

Pseudomonas aeruginosa i det kroniske sår

A: planktonisk

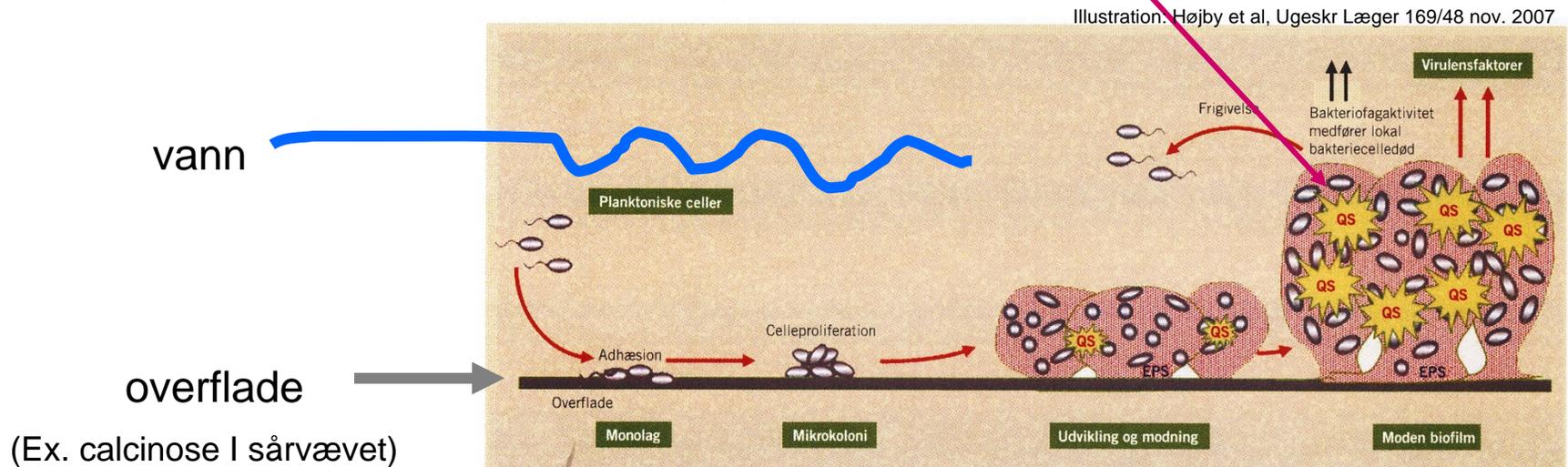
B: Microcolonier af *P. aeruginosa* i det samme sår





Extracellulær – Polymer – Substans (EPS)

- omgiver
- forankrer
- beskytter
- kan evt. indeholde extracellulært DNA (eDNA)



Figur 1. Tidsforløbet for dannelsen af en *P. aeruginosa*-biofilm baseret på in vitro-forsøg med green fluorescent protein-mærkede *P. aeruginosa*, der vokser i en flow-celle og undersøges med konfokalt skanninglasermikroskop. Processen starter med at individuelle (planktoniske) bakterieceller sætter sig på en overflade og derefter prolifererer til dannelsen af en fastsiddende mikrokoloni, der videreudvikles og modnes til en fuldt udviklet biofilm, hvorfra celle-til-celle-kommunikation (QS) aktiverer produktionen af virulensfaktorer. Bakteriofagaktivitet i biofilmen medfører lokal bakteriecelledød. Biofilmen frigiver planktoniske bakterieceller, der kan føres til andre områder, hvor biofilmdannelse så kan begynde forfra. Tykkelsen af biofilmen varierer fra 25 mikrometer til 100 mikrometer og bestemmes af ligevægten mellem vækst og frigørelse. Reproduceret med tilladelse efter [2]. EPS: hydreret ekstracellulær biofilmmatrix.



- Polysaccharid matrix
- Polypeptider
- DNA
- Bakterier (evt. forskellige arter) (forskelligt DNA)
- Signalstoffer (AHL/HSL)
- O. a.

DNA kan påvises ved PCR (polymerase chain reaction- teknik)
(Kary Mullis: Nobelpris 1993)



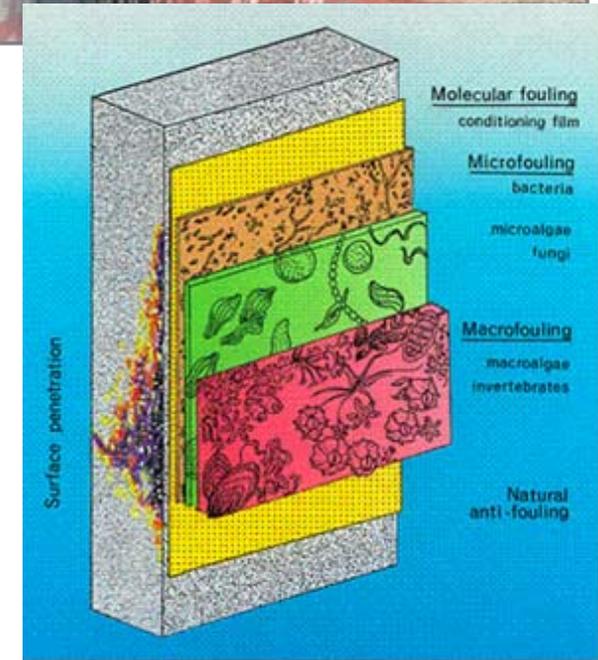
Det menes at 99 procent af al bakteriel biomasse (biodurden) findes på BIOFILM

Hvor?

- Over alt! – hvor der er fugt..
- Glatte sten på stranden
- På overfladen af f.eks.tang
- I haveslangen (når den ikke har været brugt I længere tid)
- I rensningsanlægget
- I jorden
- I bruserhovedet og bruseslangen *)
- osv



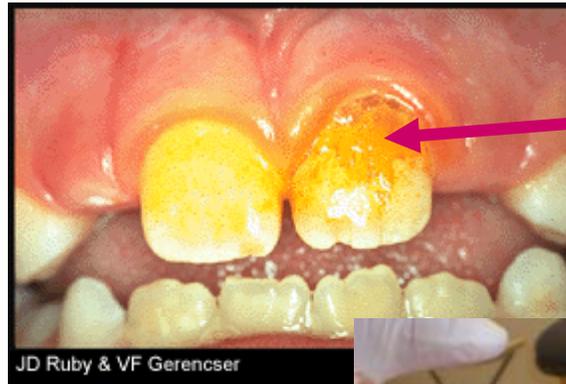
*) KKHH Brandsårsafd. Pseudomonas I brusevandet: Kolmos et al. 1993



Bio-fouling (bio-forurening):



- Otitis media
- Bakteriel endocarditis (på hjerteklapperne)
- Cystisk fibrose (Pseudomonas biofilm)
- Legionærsyge (aspiration af biofilmklumper fra brugsvand)
- Heliobakter I pylorus!
- Kateter infektioner
- Implantater (ortkir., stents, drops, dræn mm)
- Kontaktlinser
- Medical devices



- På tænder:
- I det kroniske sår:
- På bandagen!





- 1940 Journal of Bacteriology, Heukelekian and Heller: ***Surfaces enable bacteria to develop in substrates otherwise too dilute for growth. Development takes place either as bacterial slime or colonial growth attached to surfaces***
- Forskning I biofilm først fra ca. 1990.
- Samfundene taber mia I energi, skade på udstyr (incl. maskiner og skibe), sygdomme (infektions).
- Biofilm gevindst i vandrensning, jordrensning, olieforurening.
- Biofilmforskning i dag kun i sin begyndelse!



- 1. initial vedhæftning
- 2. irreversibel vedhæftning
- 3. modning fase I
- 4. modning fase II
- 5. spredning/udbredelse (dispersion)

Illustration: wikimedia.org

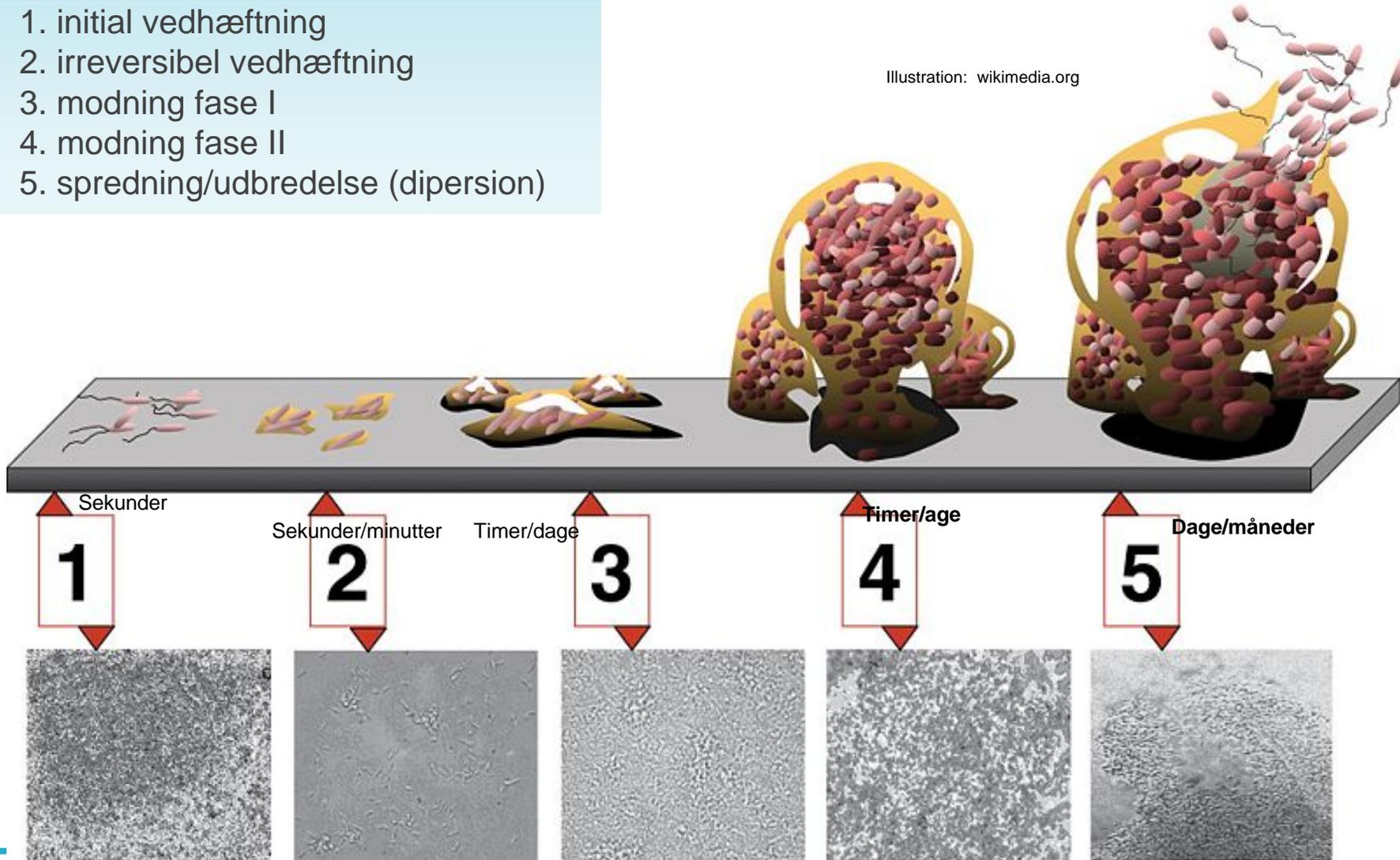
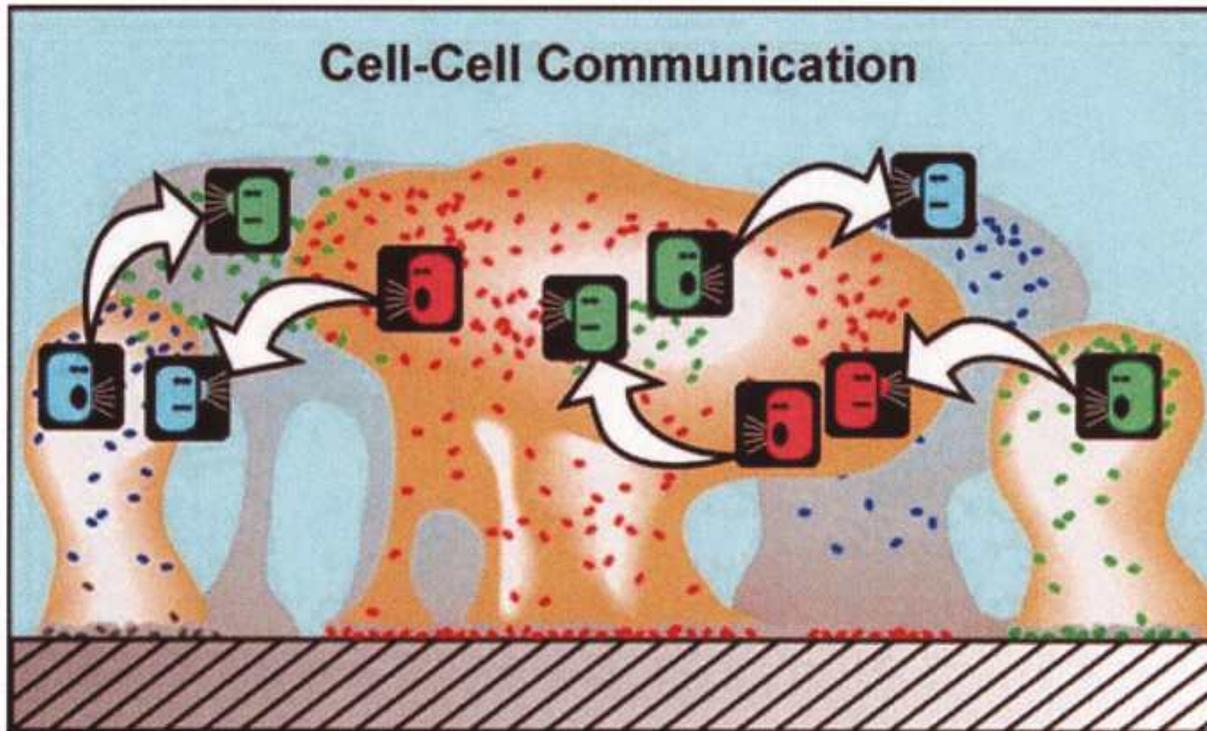




Illustration: www.erc.montana.edu



Quorum sensing
via signalmolekyler:
AHL =
acyl-homoserin-lactoner.

Når de føler de er
"mange nok" ændres
gen-ekspressionen
til produktion af
virulensfaktorer som
sætter personens im-
munforsvar ud af kraft!

In the cartoon above, various species of bacteria are represented by different colors. Bacteria can produce chemical signals ("talk") and other bacteria can respond to them ("listen") in a process commonly known as cell-cell communication or cell-cell signaling. This communication can result in coordinated behavior of microbial populations. *Courtesy, MSU-CBE.*

PSEUDOMONAS



Biofilm egenskaber



Biofilm producerer bioaktive stoffer som den enkelte bakterie ikke kan danne

Biofilm anvender kemiske våben for at Beskytte sig selv

Pigmentet violacein ligner slangegift – Paralyserer byttet – cellen begår selvmord!

Disse mekanismer begynder straks efter at Biofilmen er dannet

Matz 2008

**Destructive toxins and enzymes
Pigmentet violacein!
(virulensfaktorer)**

Welch 2008

(Angreb)

**Disinfectanter
Antibiotika
Immun-påvirkning fra værten**

(forsvar)





- Nedsat/ophævet bakteriedrab fra personens immunsystem - systemet neutraliseres
- Bakterierne utilgængelige for relevant antibiotika
- Bakterierne indkapslet overfor antiseptika (detergentia)
- Langtidsarkivering af bakteriebyrden (bioburden)
- Vækst af bioburden indenfor biofilmkonsortiet
- Opblussen af infektion/bakteriæmi
- Fastholder sår I kronisk stadie?
- mm



- Ingen effekt af antibiotika
- Ingen inflammatorisk reaktion (som normalt genereres af polymorfkernede neutrofile PMN's)
- **Fokus** som affyrer bakterier
- Implantat må fjernes for at sanere
- Sårbund må exideres for biofilmfoci – frit i sårvæv eller placeret på subcutant kalk (calcinose)





- Udkonkurrere signalmolekylerne (quorum sensing inhibitorer QSI) som lammer bakteriekommunikationen - “jamme kommunikationen”
- Nedbryde biofilmmatrix
- QSI vil give personens normale immunrespons mulighed for at nedkæmpe de fri (planktoniske) bakterier
- Åbne mulighed for traditionel AB-behandling
- Antibiotika besparelse?
- Reducere resistensudvikling!



- Tangart danner “furanoner” som forhindrer biofouling (idet de “jammer” kommunikationen) – desværre giftigt for mennesker!
- Naturligt forekommende hvidløg (2% ekstrakt)
- Syntetiserede meget meget kostbare QSI
- Azitromycin (kendt antibiotikum – Zithromax - macrolid) I højdosis
- Formentlig mange andre

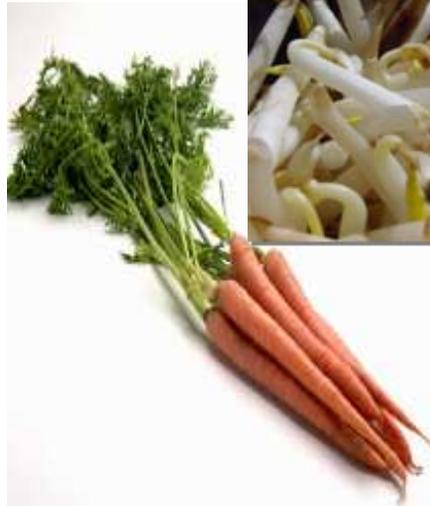
Naturens quorum sensing-blokkere (QSI)



Sample

QS blocker

Bean sprout	+
Blackberry	-
Brown onion	-
Chamomile	+
Carrot	+
Coffee	-
Cranberry	-
Poison Ivy	-
Garlic	+
Gele Royal	-
Ginseng	-
Habanero	+
Honey (various sorts)	-
Leek	-
Mint-tea	-
Propolis	+
Raspberry	-
Red Chili	-
Spring onion	-
Tea Tree Oil	-
Water Lilly	+
Yellow pepper	+
Blood (plasma)	-
Stinging nettle	-



Anemone
Snowberry



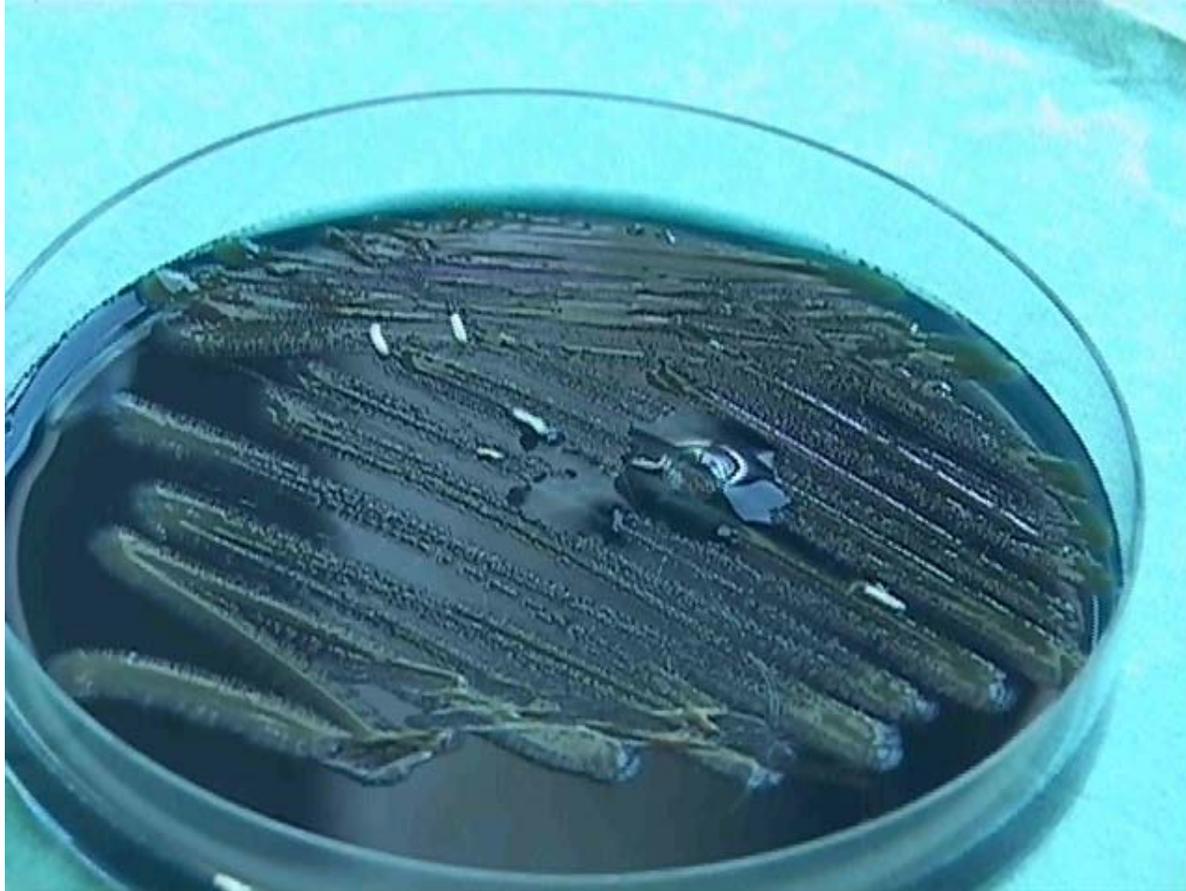
- Eddike?
- Polyhexanid
- Udtørring??
- Fjernelse!
- Sølv?? (måske bedre i kombination med en QSI?)





- Signal-blokkere (quorum sensing blokkere) – furanon-jammere..
- Kemisk spaltning
- Termodynamik
- Surfactanter (polyhexanider/biguanider)
- Mekanisk spaltning
- Fotodynamik
- Bakteriophager
- Biokirurger (fluelarver) – ikke pseudomonas QS
- Rigtig kirurgi (ekscision)
- Og sikkert andre mekanismer..

Husk: Biofilm er ikke alene et overfladefænomen!



Det kroniske sår



vene

Det kroniske sår

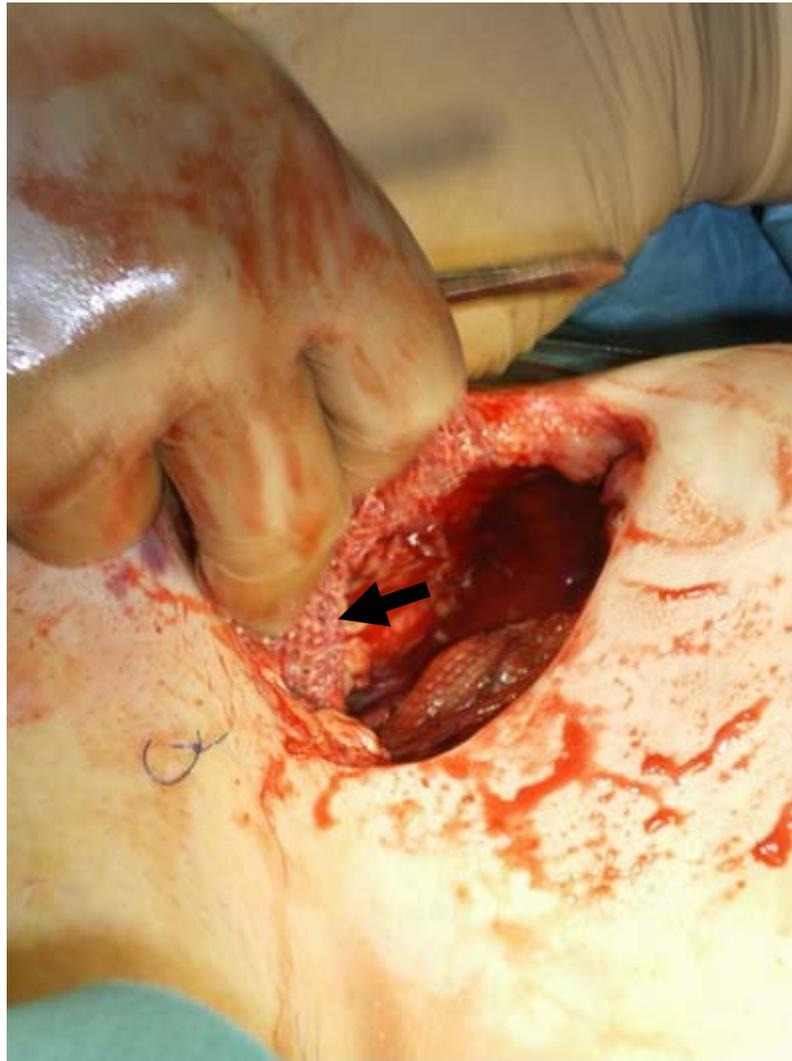


Det kroniske sår



Tryksår

Det kroniske sår



Net-plug
(herniotomi)

Udviklede gangræn
(Fourniers) 3 – 4 uger
efter brokoperationen

Patienten havde
diabetes - - og blev
67 år...





Pilonidal-cyste seqv.

Det kroniske sår



Pseudomonas aeruginosa I kronisk bensår





- Heler langsommere end forventet
- Et sår som ikke er ophelet på 3 måneder
- Et sår der aldrig heler
- Et sår som ikke heler på trods af adækvat kausalbehandling



- Gødsbøl et al, 2006 Copenhagen Wound Healing Center:
 - *Staphylococcus aureus* (93.5%)
 - *Enterococcus faecalis* (71.7%)
 - *Pseudomonas aeruginosa* (52.2%)
 - Coagulase-negative staphylococci (45.7%)
 - *Proteus* species (41.3%)
 - Anaerobic bacteria (39.1%)



PMN's rolle I sårheling

- Optræder I det akutte sår indenfor 6 timer
- Fjerner debris og bakterier ved fagocytose
- Tiltrækker andre immunologiske komponenter
- Makrofager overtager gradvist PMNérnes funktion
- PMN forsvinder sædvanligvis efter 48 timer fra sårvæsken

PMN = polymorfkernede neutrocytter

Kroniske sår med *Pseudomonas aeruginosa*

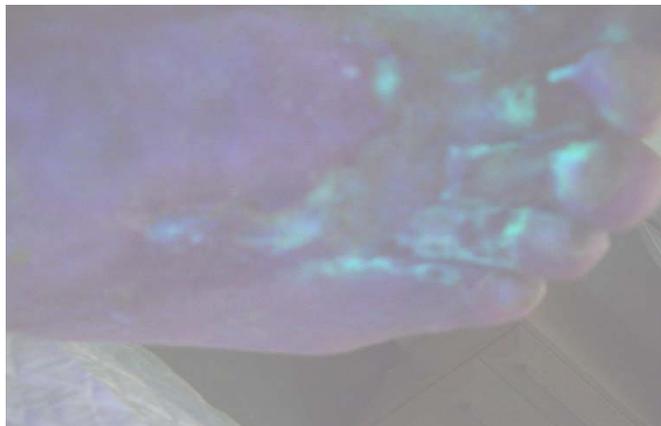
- Er større – og heler langsommere

Gødsbøl et al, Int Wound J. 2006 Sep;3(3):225-31

Madsen et al, APMIS. 1996 Dec;104(12):895-9.

- Har højere niveau af metalloproteases, specielt i kombination med multiple bakterier

Lobmann R et al, Oral presentation DFSG 2005



Flourescerende pseudomonader



- Sårbakterier (**Pseudomonas**) danner **biofilmkolonier** i sår.
- Via **quorum sensing (QS)** danner bakteriesamfundet **virulensfaktorer**.
- Disse virulensfaktorer (rhamnolipider) fungerer som et skjold mod **PMN** (polymorfkernede neutrofile).
- PMN forhindres i at nedbryde **Pseudomonas**
- Værten fortsætter med at bombardere med PMN-er
- PMN-erne frigør **MMP** (metalloproteaser = typisk for det kroniske sår)
- MMP nedbryder
- Såret består som **kronisk**

Bjarnsholt et al. 2008



- Hvornår behandle det kroniske sår?
- Biofilmdannende bakterier i det?
- Nedbryde biofilm?
- Behandle med QS-inhibitorer?
- Behandle med konventionelle antibiotika?
- Manglende heling
- Pseudomonas
- Ag?
- Hvidløg?
- Ciprofloxacin?

Systemisk og/eller lokal-behandling?
Imprægnede bandager (QSI)

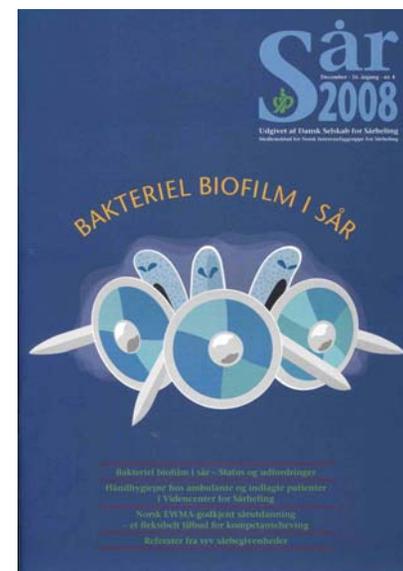


- Højby, 2007 ugeskr læger 169/48
- Bjarnsholt et al, Wound rep reg 2008 16 2-10
- **Google:** Biofilm and Montana
- **Google:** Biofilm and Nottingham

Fra 1. januar 2009 har medlemmer af Dansk Selskab for Sårheling samt abonnenter på bladet SÅR adgang til artikelsamlingen på www.saar.dk.

For hver ny udgivelse af SÅR ændres adgangskoden.
Nyeste kode vil altid kunne findes på dette sted i bladet.

Brugernavn: Saar084
Adgangskode: 12cv34x



Tak for nu – i Bodø!





- **Biofilm** – en polysaccharid matrix - extracellulær polymer substans (EPS)
- **Signal molekyler** – AHL/SL (acyl-homoserin-lacton) fungerer som “netværk” eller “sprog”
- **Quorum sensing** – den proces hvormed bakterier koordinerer deres gen-expression ved at producere signalmolekyler (AHL)
- **Quorum** (lat. *af hvilke*) – det beslutningsdygtige antal medlemmer af en forsamling
- **Sensus** (lat. *sans*)
- **Planktonisk** – flyder med strømmen (modsat: Nektonisk – bevæger sig mod strømmen)
- **Biofouling** – bio-forurening (på overflader)
- **Opportunistisk** – handlemåde som udnytter eller tilpasser sig forholdene uden hensyn til gældende regler eller principper