



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Ocena zdolności klinicznych szczepów bakteryjnych
do tworzenia biofilmu
oraz możliwości jego eradykacji z cewników moczowych
za pomocą metod chemicznych i fizycznych**

Monika Oleksy-Wawrzyniak

Promotor

Dr hab. n. med. Marzenna Bartoszewicz prof. nadzw.

Promotor pomocniczy

Dr hab. n. med. Adam Junka

Wrocław 2019

Streszczenie

Zakażenia układu moczowego (ZUM) należą do najbardziej rozpowszechnionych infekcji występujących u ludzi. 80% uroinfekcji szpitalnych związanych jest z obecnością cewnika moczowego, a bakterie zdolne przylegać do powierzchni biomateriałów są obecne zarówno w powietrzu sali operacyjnej i sprzęcie medycznym, jak i na skórze chorego i personelu. Tworzenie biofilmu na powierzchni cewników urologicznych jest niezwykle istotnym czynnikiem ryzyka wystąpienia infekcji układu moczowego związanej z obecnością kateteru (CAUTI, ang. Catheter-associated Urinary Tract Infections).

Celem pracy była ocena zdolności drobnoustrojów będących częstym czynnikiem etiologicznym ZUM do tworzenia biofilmu oraz możliwości jego usuwania z powierzchni cewników moczowych.

Badaniem objęto 396 klinicznych szczepów z gatunków *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* i *Enterococcus faecium* oraz 6 odpowiednich szczepów referencyjnych, reprezentujących wyżej wymienione gatunki. Wybrane izolaty kliniczne charakteryzowały się szerokim profilem lekooporności i pochodziły od pacjentów przewlekle hospitalizowanych.

Analiza zdolności do tworzenia biofilmu prowadzona była dwutorowo. Oceniano zarówno elementy morfotyczne w badanej strukturze, jak również ilość i skład zewnątrzkomórkowej matrix. Badania prowadzone były za pomocą standardowych analiz płytkowych oraz w układach doświadczalnych imitujących warunki występujące u pacjenta z założonym cewnikiem do pęcherza.

Przesiewowe badanie pomiaru całkowitej biomasy biofilmu utworzonego na polistyrenie, w pełnym medium hodowlanym pozwoliło na wstępny podział analizowanych drobnoustrojów na grupy o zróżnicowanych zdolnościach formowania struktury biofilmu. Półilościowa ocena liczby żywych komórek adherujących do podłoża w wyżej wymienionych warunkach wykazała zróżnicowanie pomiędzy szczepami wewnątrz wyodrębnionych wcześniej grup. Otrzymane wyniki świadczą o dużym zróżnicowaniu wewnątrzgatunkowym zdolności do tworzenia biofilmu oraz istotnym znaczeniu macierzy zewnątrzkomórkowej w formowaniu tej struktury. Badane gatunki Gram-ujemnych pałeczek tworzyły biofilm silniej niż analizowanego Gram-dodatniego

ziarniaka, co potwierdza istotny udział tych drobnoustrojów w zakażeniach o patogenezie biofilmowej.

Wykorzystując technikę posiewów ilościowych wykazano, że spośród analizowanych gatunków drobnoustrojów najwyższym powinowactwem do powierzchni cewnika typu Nelaton cechowały się komórki *Escherichia coli*. Również w warunkach przepływu medium, biofilm *E. coli* oceniany metodą Richards'a był znacząco silniejszy w eksperymencie z użyciem kateteru niż utworzony stacjonarnie na polistyrenie. Uzyskane wyniki wskazują na zależność siły tworzenia biofilmu od struktury i składu chemicznego powierzchni przylegania.

Klebsiella pneumoniae w warunkach przepływowych w sztucznym moczu z glukozą tworzyła biofilm znacząco silniej niż w standardowych warunkach laboratoryjnych. Z kolei *Enterococcus faecium* silnie tworzący biofilm w badaniach przesiewowych, silnie adherujący do powierzchni kateteru stacjonarnie, w przepływającym sztucznym moczu zawierającym glukozę tworzył biofilm na powierzchni cewnika na tyle słabo, że ilość adherowanych komórek nie była mierzalna metodą Richards'a. Otrzymane wyniki wskazują, że stosowane rutynowo w badaniach nad biofilmem typowe warunki laboratoryjne nie odzwierciedlają prawdziwego poziomu zagrożenia jakie niesie za sobą tworzenie się biofilmu na biomateriałach w organizmie człowieka, a polichlorek winylu nie jest, z punktu widzenia zapobiegania odcewnikowym ZUM, bezpiecznym materiałem do produkcji kateterów.

Oceniając zdolność do tworzenia biofilmu w mediach imitujących mocz ludzki stwierdzono, że obecność glukozy stymuluje proliferację i/lub aktywność metaboliczną komórek *E. coli* i *E. faecium*, co potwierdza wysoki udział pierwszego z nich i rosnący drugi w ZUM występujących u pacjentów z przekroczonym progiem nerkowym w wyniku cukrzycy. Podobne obserwacje opisują również inni badacze.

Doświadczenia oceniające zdolność do produkcji śluzu wykazały, że powszechnie stosowane metody nie są wystarczająco specyficzne, powtarzalne i porównywalne. Oceniając morfologię hodowli na podłożu z czerwienią Kongo oraz porównując wyniki absorbancji w badaniu zewnątrzkomórkowego śluzu metodą Christensena stwierdzono, że obecność mono- lub disacharydów w środowisku niezwykle silnie stymuluje produkcję zewnątrzkomórkowej macierzy u szczepów z gatunku *Enterococcus faecium*.

Izolacja i analiza składu cząsteczkowego zewnątrzkomórkowej matrix wykazała znacząco wyższe stężenie pentoz i heksoz w próbkach biofilmowych badanych gatunków w porównaniu do ich planktonicznych odpowiedników, co może sugerować obecność w analizowanym materiale polimerowej, wielocukrowej macierzy biofilmowej. Dodatkowo, wyższe względne stężenie w próbkach biofilmowych aminokwasów rozgałęzionych, które u bakterii tworzone są z prekursora metylomaślanu, świadczy o względnie beztlenowych/beztlenowych warunkach rozwoju bakterii, co z kolei jest cechą charakterystyczną dla głębokich warstw dojrzałej struktury biofilmu.

Wykazano zatem, że zdolność tworzenia biofilmu jest cechą szczepo-zależną i ma związek zarówno z liczbą adherujących do podłoża komórek jak i ilością zewnątrzkomórkowej matrix. Jednocześnie, siła tworzenia biofilmu zależy od rodzaju powierzchni przylegania, składu medium hodowlanego oraz warunków hodowli a obecność w środowisku glukozy może być czynnikiem promującym tworzenie silnych struktur biofilmu wewnątrz światła cewnika.

W badaniach wpływu wybranych substancji na utworzony biofilm wykazano, że najwyższym poziomem skuteczności wobec analizowanych gatunków charakteryzowały się miejscowo działające związki przeciwdrobnoustrojowe należące do antyseptyków/lawaseptyków – najniższe wartości MBEC (ang. Minimal Biofilm Eradication Concentration) stwierdzono dla poliheksanidyny. Pomimo rekomendacji dotyczących stosowania ciprofloksacyny w ZUM niepowikłanych wobec *Enterococcus* i powikłanych ZUM o etiologii Gram-ujemnych pałeczek, otrzymane wyniki wskazują, że badany antybiotyk nie jest najskuteczniejszym lekiem w terapii ZUM związanych z powstawaniem biofilmu. Peptydy wykazywały aktywność przeciwdrobnoustrojową (jakkolwiek niską) jedynie wobec biofilmu utworzonego przez Gram-dodatnie ziarniaki, natomiast analizowane detergenty, w badanym zakresie stężeń nie powodowały znaczącej redukcji biofilmu żadnego z gatunków. Zaobserwowano, że środki przeciwdrobnoustrojowe cechowały się wyższą skutecznością w eradykacji biofilmu w medium zbliżonym do moczu człowieka niż w pełnym medium hodowlanym a mechaniczne przepłukiwanie kateteru może być skuteczną formą usuwania biofilmu z jego powierzchni.

Złożoność struktury biofilmu oraz poziom zagrożenia rozwojem infekcji o tej patogenie skłania do przeprowadzenia pogłębionych badań nad drobnoustrojami

w postaci biofilmowej. Należy dążyć do zastąpienia rutynowo stosowanych w laboratoriach metod analiz biofilmu protokołami odzwierciedlającymi warunki *in vivo* oraz wdrażać metody o wysokiej dokładności, specyficzności i powtarzalności. Poszukiwanie nowych rozwiązań w zwalczaniu biofilmu oraz terapii związanych z nim infekcji jest nie tylko aktualnym, ale coraz pilniejszym do rozwiązania, problemem badawczym.

Abstrakt

Urinary tract infections (UTIs) are among the most common human infections. 80% of hospital uroinfections are associated with the presence of an urinary catheter, and bacteria capable of adhering to the surface of biomaterials are present both in the air of the operating room and medical equipment, as well as on the skin of the patient and staff. The formation of a biofilm on the surface of urological catheters is an extremely important risk factor of urinary tract infection associated with the presence of a catheter (CAUTI, Catheter-associated Urinary Tract Infections).

The aim of the study was to assess the ability of microorganisms which are a frequent etiological factor of UTI to form a biofilm and to assess the possibility of a biofilm eradication from the surface of urinary catheters.

The study included 396 different strains from the species of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* and *Enterococcus faecium*, and 6 reference strains of these species. Selected clinical isolates displayed multi-drug resistance profile and were isolated from the chronically hospitalized patients.

The analysis of the ability to form biofilm was conducted in two ways. Both morphotic elements in the examined structure as well as the amount and composition of extracellular matrix were evaluated. The studies were conducted using standard plate analyzes and experimental systems imitating the conditions in a patient with a bladder catheter.

The screening test for measuring the total biomass of a biofilm formed on polystyrene in full culture medium allowed for the initial division of the analyzed microorganisms into groups with different biofilm formation capabilities. A semi-quantitative

assessment of the number of viable cells adhering to the surface of the plate under the same conditions showed differentiation between strains within the previously isolated groups. The obtained results showed a large diversity of intraspecific ability to create a biofilm and an important role of extracellular matrix in forming this structure. The examined Gram-negative rod species formed a biofilm more strongly than the analyzed Gram-positive cocci, which confirms the significant role of these microorganisms in biofilm pathogenesis infections.

Escherichia coli cells had the highest affinity for the Nelaton's catheter surface using the quantitative culture technique. Under flow conditions, the *E. coli* biofilm assessed by the Richards method was significantly stronger in the catheter than this structure grown stationary on polystyrene surface. The obtained results indicate the dependence of the biofilm formation ability on the structure and chemical composition of the contact surface.

Klebsiella pneumoniae, under flow conditions in artificial urine medium with glucose, formed a biofilm significantly stronger than in standard laboratory conditions. In turn, *Enterococcus faecium* strongly forming a biofilm in screening test and strongly adhering to the surface of the catheter stationary, in flowing artificial urine containing glucose formed a biofilm on the surface of the catheter weakly and it was not measurable by the Richards' method. The results obtained indicate that the typical laboratory conditions routinely used in biofilm researches do not reflect the real level of danger associated with a biofilm formation on biomaterials in the human body, and polyvinyl chloride is not a safe material for catheter production from the point of view of UTIs prevention. Assessing the ability to create a biofilm in media imitating human urine, it was found that the addition of glucose stimulates the proliferation and / or metabolic activity of *E. coli* and *E. faecium* cells, which confirms the high participation of the first of them and growing share of the second in UTI occurring in patients with exceeded renal threshold as a result of diabetes. Other researchers also describe similar observations. Experience assessing mucus production ability has shown that commonly used methods are not specific, repeatable and comparable enough. Assessing the morphology of culture on Congo Red Agar and comparing absorbance results in the extracellular mucus test by Christensen method, it was found that the presence of mono-

or disaccharides in the environment stimulates the production of extracellular matrix in strains of *Enterococcus faecium* species extremely strongly.

Isolation and analysis of the molecular composition of the extracellular matrix showed a significantly higher concentration of pentoses and hexoses in biofilm samples of the tested species compared to their planktonic counterparts, which may suggest the presence of a polysaccharide biofilm matrix in the analyzed material. In addition, the higher relative concentration in the biofilm samples of branched chain amino acids, which in bacteria are formed from the methylbutyrate precursor, is indicative of the relatively anaerobic/anaerobic conditions for bacterial growth, which in turn is a characteristic feature of the mature biofilm deep layers structure.

Therefore, the ability to create a biofilm has been shown to be a strain-dependent feature, associated with both the number of cells adhering to the surface and the amount of extracellular matrix. At the same time, the strength of a biofilm formation depends on the type of contact surface, culture medium composition and incubation conditions. Moreover, the addition of glucose in the environment can be a factor promoting the formation of strong biofilm structures inside the catheter. In studies of the influence of selected substances on the biofilm formed, it was shown that the highest level of effectiveness against the analyzed species was found for locally acting antimicrobial compounds (antiseptics / lawaseptics) - the lowest MBEC (Minimal Biofilm Eradication Concentration) values were found for polyhexanidine.

Despite the recommendations regarding the use of ciprofloxacin in UTIs uncomplicated with *Enterococcus* and complicated UTIs with etiology of Gram-negative bacilli, the obtained results indicate that this antibiotic is not the very effective drug in the treatment of UTIs associated with the biofilm formation. The peptides showed antimicrobial activity (although low) only against the biofilm formed by Gram-positive cocci, while the analyzed detergents in the tested concentration range did not significantly reduce the biofilm of any species. It was observed that antimicrobials were more effective in a biofilm eradication in a medium similar to human urine than in a full culture medium and mechanical catheter flushing could be an effective form of a biofilm removal from its surface.

The complexity of the biofilm structure and the level of risk of developing infections with this pathogenesis prompts to carry out in-depth research

on biofilm-forming microbes. Efforts should be made to replace biofilm analysis methods routinely used in laboratories with protocols that reflect *in vivo* conditions, and methods with high accuracy, specificity and repeatability should be implemented. The search for new solutions in a biofilm eradication and the therapy of a biofilm related infections is not only a current, but more and more urgent research problem to solve.