

DIAGNOSTYKA I HODOWLA BIOFILMU BAKTERYJNEGO Z IZOLATÓW POWODUJĄCYCH ZAPALENIE ZATOK



A. Gibała^{1,3,4}, B. Wąsik¹, J. Szaleniec², M. Szaleniec³, T. Gosiewski⁴



¹ Zakład Mikrobiologii Klinicznej, Uniwersytecki Szpital Dziecięcy w Krakowie
² Katedra i Klinika Otolaryngologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
³ Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera PAN
⁴ Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

WSTĘP:

Przewlekłe zapalenie zatok przynosowych (PZZP) to obecnie jedna z najbardziej uciążliwych dolegliwości dla pacjentów. Schorzenie to spowodowane jest przez kompleks wzajemnie oddziałujących czynników egzogennych i endogennych. W przeszłości uważano, że pierwotną przyczyną rozwoju choroby może być przedłużająca się infekcja bakteryjna. W świetle aktualnych badań rzeczywista rola drobnoustrojów w patogenezie PZZP jest niejasna. Infekcje bakteryjne mają natomiast niewątpliwe znaczenie jako czynnik powodujący zaostrzenia choroby.

CEL PRACY

Identyfikacja najczęściej występujących drobnoustrojów u pacjentów z zaostrzeniem objawów chorobowych w PZZP i ocena możliwości tworzenia przez nie biofilmu.

MATERIAŁY I METODY:

Badaniami zostało objętych 38 pacjentów zgłaszających się do Poradni Kliniki Otolaryngologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie z zaostrzeniem objawów chorobowych po operacjach endoskopowych zatok. Badania zostały zaakceptowane przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego opinia nr 1072.6120.208.2017 z dnia 30 listopada 2017 r.

Wymazy posiewano standardowo na płytki: Columbia Agar z 5% krwia baranią, McConkey Agar oraz Agar Czekoladowy z bacytracyną (Argenta Sp. z o.o.)

Po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C z dostępem CO₂, wyhodowane bakterie poddano standardowej identyfikacji do gatunku, a pomocniczo używano testów BD Phenix Panels (Becton Dickinson) (Ryc. 1).

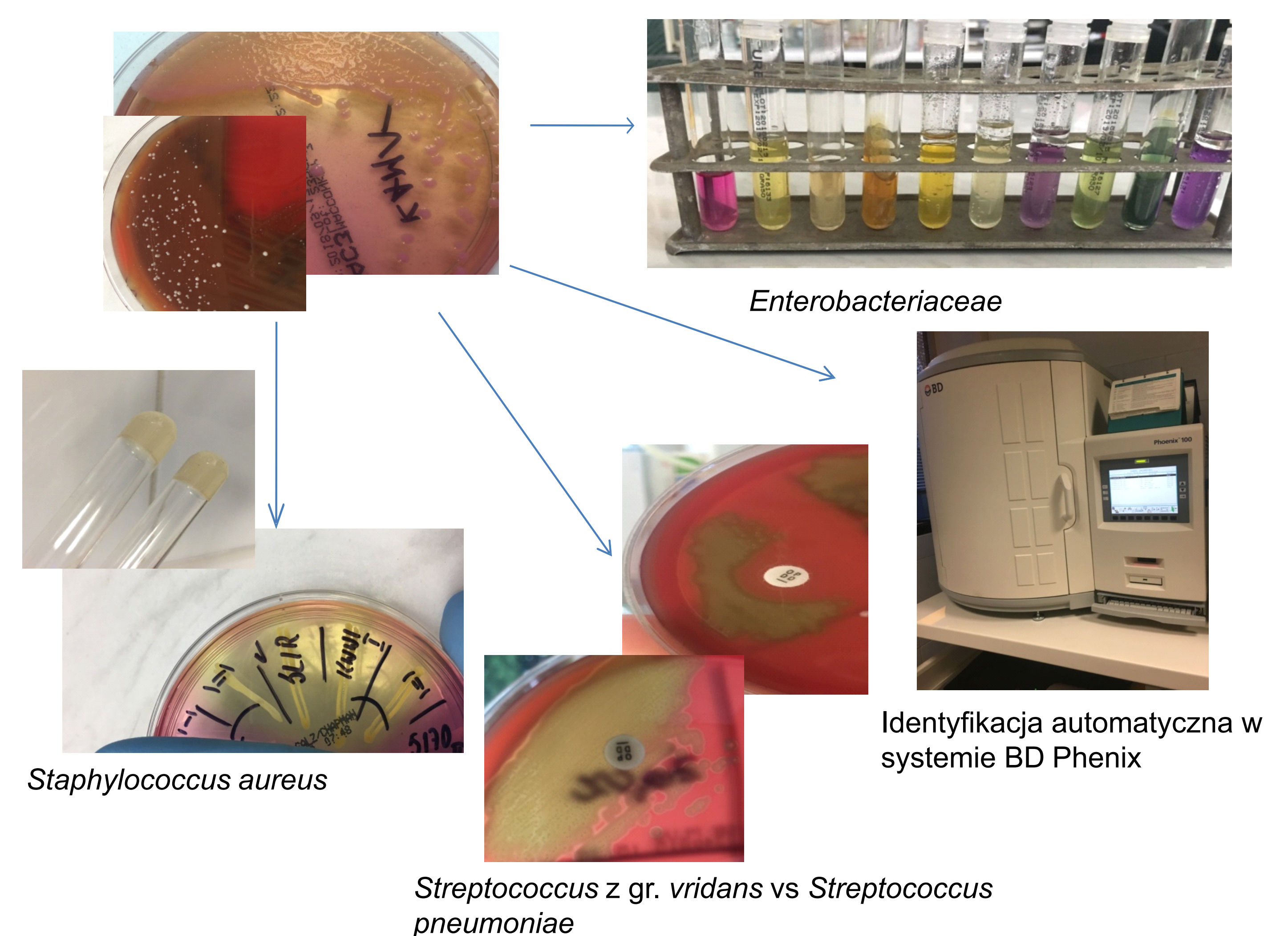
Wyhodowane szczepy poddano badaniu na tworzenie biofilmu bakteryjnego. Hodowlę biofilmu prowadzono na płytkach 24-o dołkowych (Axygen) przez 24 godziny w temperaturze 37°C z dostępem CO₂ jak przedstawiono na schemacie (Ryc. 2).

Poziom wytworzonego biofilmu mierzono za pomocą absorbancji przy długości fali λ=570 nm (Ryc. 3), a strukturę sprawdzano przy pomocy skaningowego mikroskopu konfokalnego LSM 780 zbudowanego na optycznym mikroskopie odwróconym (AxioObserver Z1 firmy Zeiss) (Ryc. 4)

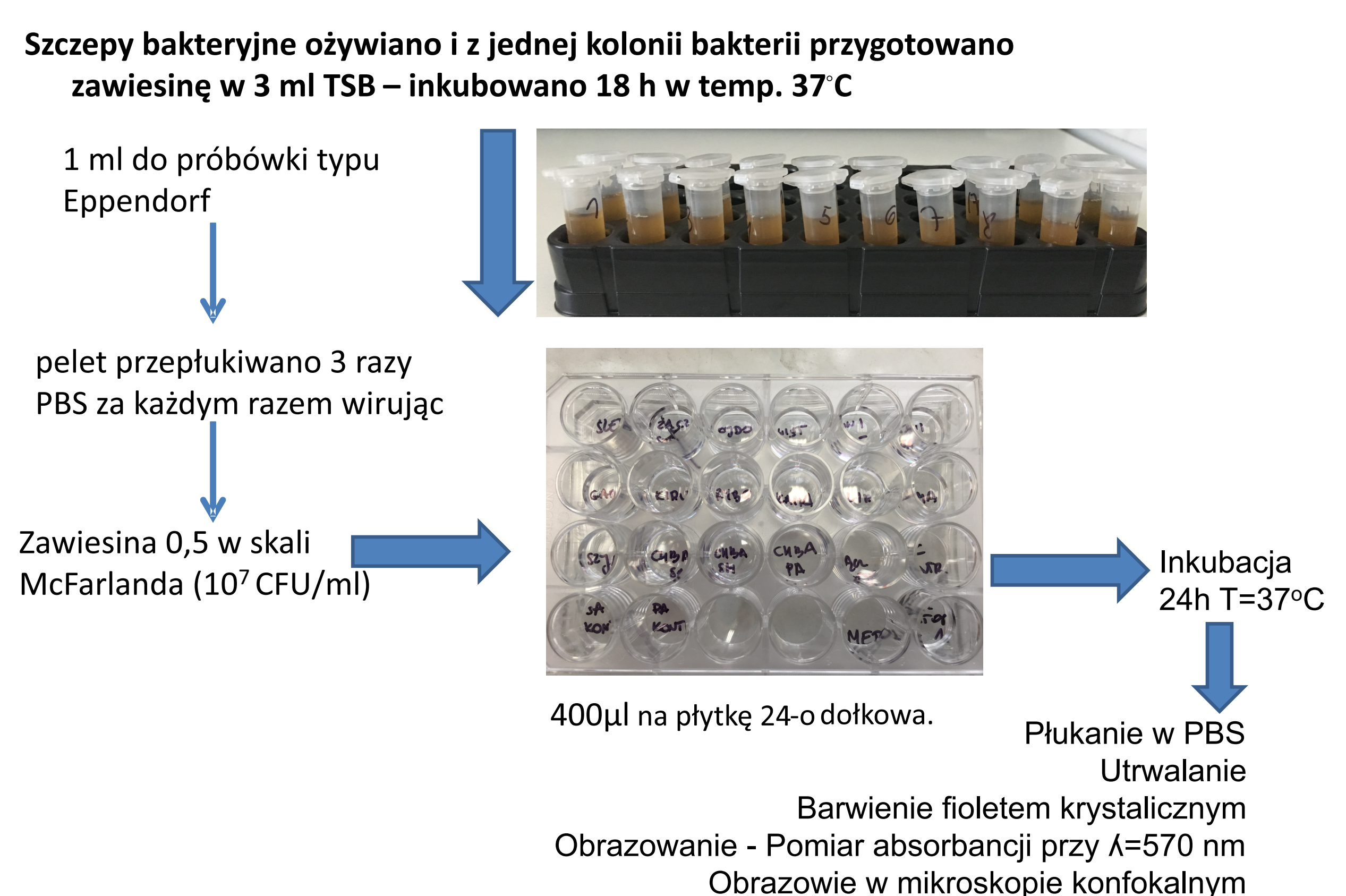
WYNIKI:

Podczas identyfikacji izolatów okazało się, że głównym hodowanym drobnoustrojem był *Staphylococcus aureus* (u około 60% pacjentów). Innymi istotnymi patogenami były *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* i *Klebsiella oxytoca*. U około 18% pacjentów stwierdzono florę, która u większości populacji występuje fizjologicznie w górnych drogach oddechowych (*Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus* z grupy viridans, czy *Streptococcus pneumoniae*) (Ryc. 5).

Wyhodowane szczepy ponadto sprawdzono pod względem występowania mechanizmów oporności i u 17 pacjentów stwierdzono występowanie mechanizmów oporności na antybiotyki (Ryc. 6).



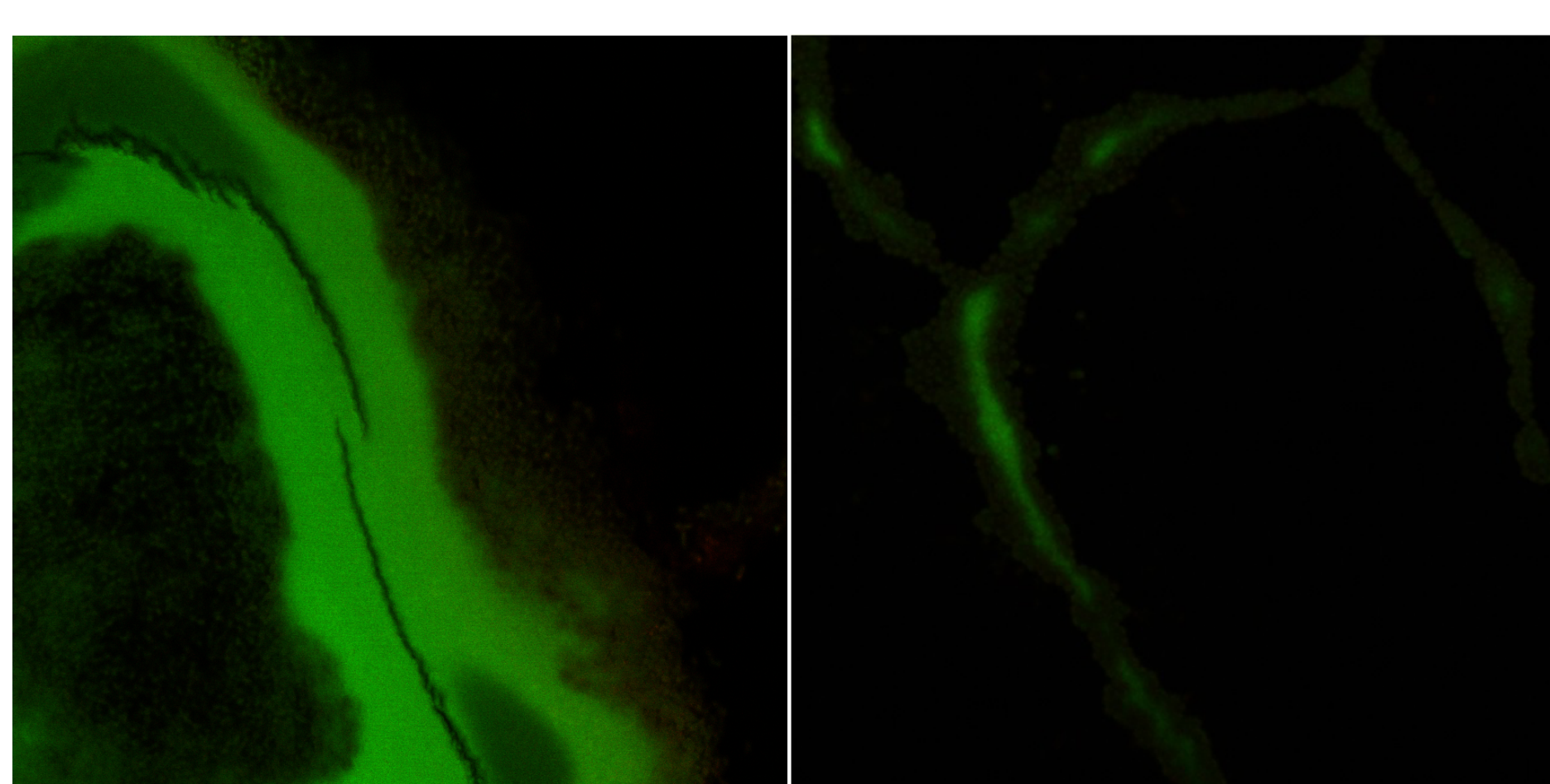
Rycina 1. Standardowa identyfikacja drobnoustrojów.



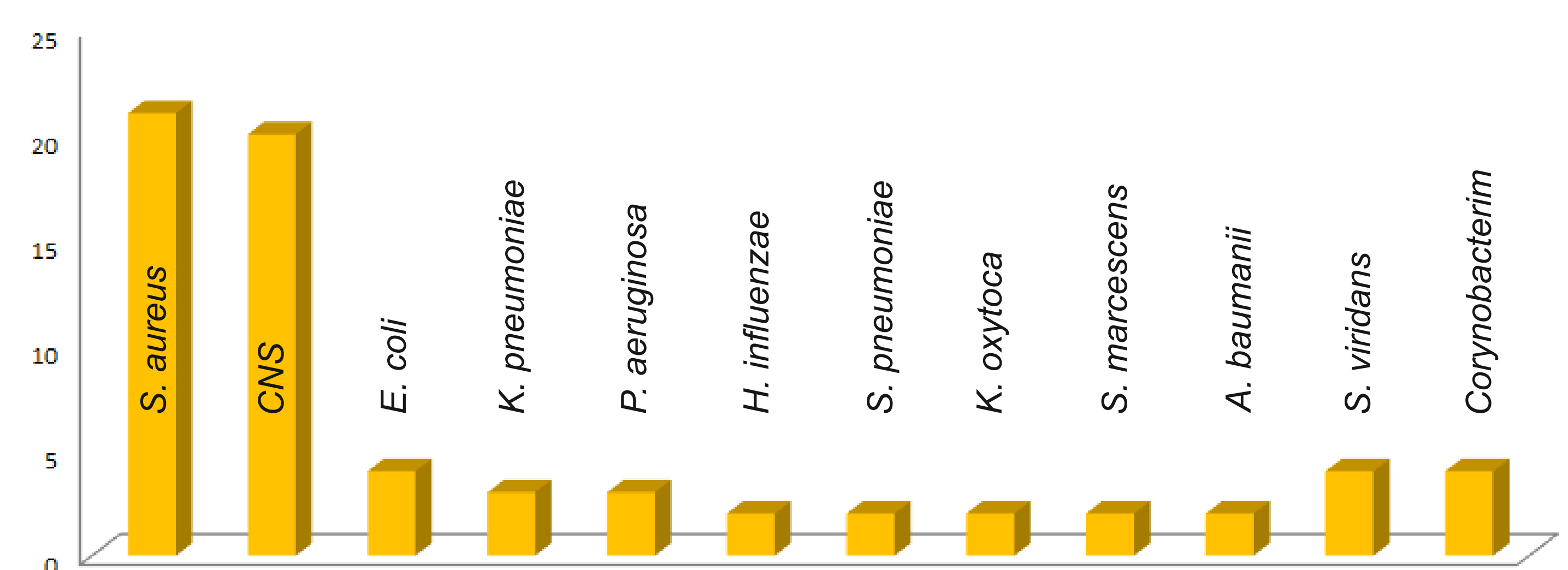
Rycina 2. Schemat postępowania przy hodowli

	A	B	C	D	E	F	G	H
1		1	2	3	4	5	6	
2	A							Blitmap [570]
3	B							Blitmap [570]
4	C							Blitmap [570]
5	D							Blitmap [570]

Rycina 3. Pomiar absorbancji λ=570 nm. Kolor niebieski świadczy o obecności biofilmu.

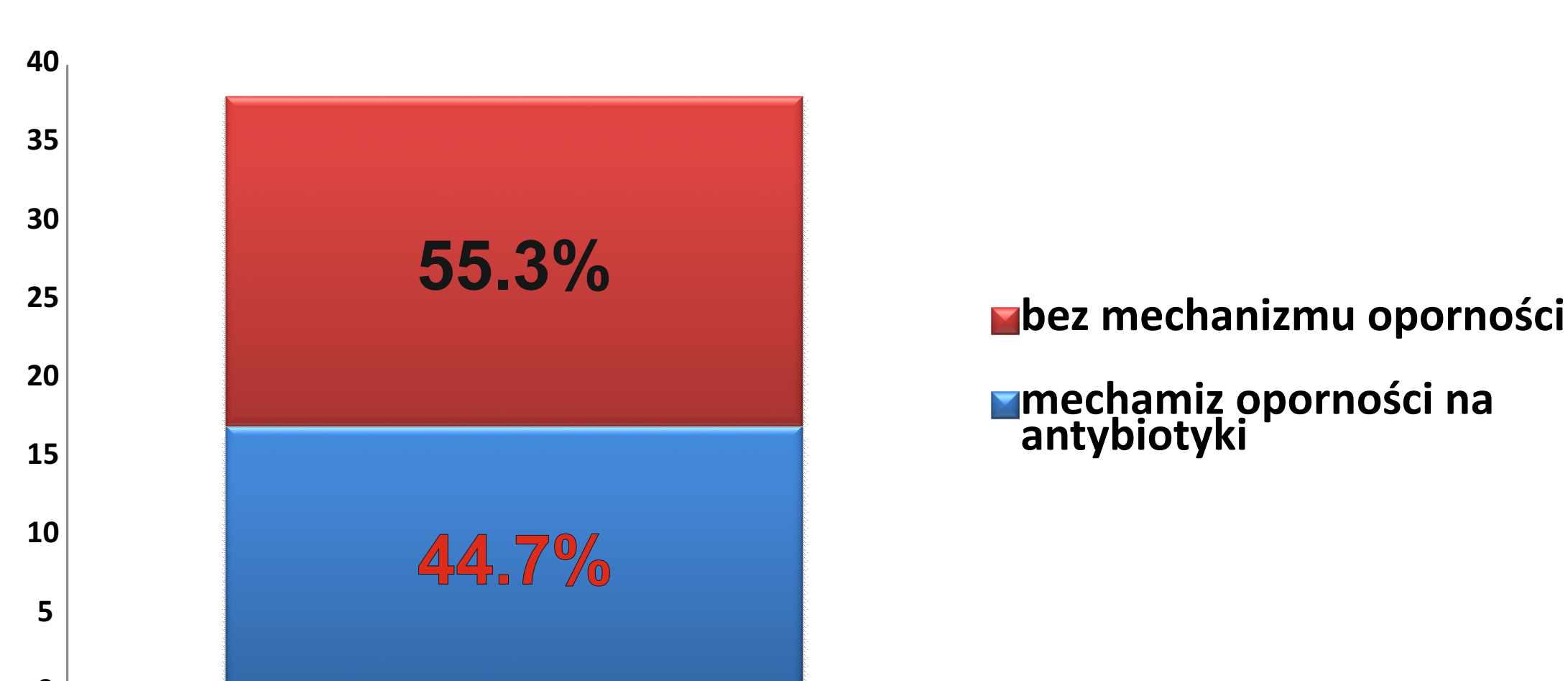


Rycina 4. Przykładowe zdjęcie z mikroskopu konfokalnego wyhodowanego biofilmu

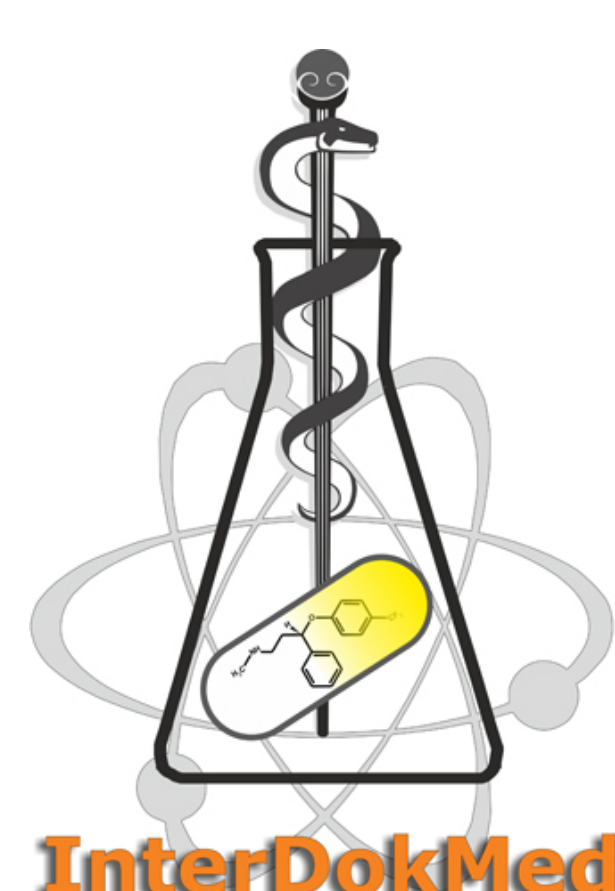


Rycina 5. Różnorodność taksonomiczna izolatów bakteryjnych wyhodowanych od pacjentów z PZZP

Występowanie mechanizmów oporności u pacjentów z PZZP



Rycina 6. Odsetek szczepów opornych



WNIOSKI:

- Różnorodność taksonomiczna wyhodowanych drobnoustrojów może ewentualnie świadczyć o złożonej etiologii przewlekłego zapalenia zatok przynosowych.
- Wszystkie wyhodowane szczepy bakteryjne wytwarzały biofilm, co mogło być przyczyną uporczywego nawracania objawów chorobowych u pacjentów z PZZP.
- Standardowe leczenie antybiotykami mogło jedynie złagodzić objawy chorobowe, w związku z występowaniem mechanizmów oporności u pacjentów objętych badaniem