



Katrin Dohnt (Autor)

Charakterisierung von *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilmen in einem *in vitro*-Harnwegskathetersystem



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/256>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

1 Einleitung und Zielsetzung

Immer häufiger hält der Begriff „Biofilm“ Einzug in die Medizin und die medizinische Forschung. Dabei stellen Biofilme sessile mikrobielle Lebensgemeinschaften dar, die eingebettet in eine selbstproduzierte extrazelluläre Matrix an Oberflächen oder Phasengrenzflächen adhärieren [66, 110]. Die extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), wie Polysaccharide, Proteine, Nukleinsäuren und Lipide, ermöglichen den Biofilmen die Ausbildung dreidimensionaler Strukturen bestehend aus Mikro- und Makrokolonien und schützen die darin eingebetteten Zellen z. B. vor Austrocknung und Antibiotika [109, 280, 326]. Weitere Mechanismen, wie die Ausbildung von Persistern, erhöhen die Antibiotikaresistenz der Biofilme und erschweren so eine antibiotische Behandlung [371].

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass Infektionen verstärkt auf die Bildung von Biofilmen zurückzuführen sind. Heute ist bekannt, dass Otitis media, chronische Wundinfektionen und Parodontitis Erkrankungen sind, die durch sessil lebende Mikroorganismen verursacht werden [89, 186, 189, 276]. Aber auch der Einsatz von medizinischen Geräten und Implantaten, auf denen sich Biofilme ansiedeln, ist mit Risiken verbunden [86]. So handelt es sich bei 40 % aller nosokomialen Erkrankungen um Harnwegsinfektionen, die in bis zu 90 % der Fälle mit dem Einsatz von Harnwegskathetern in Verbindung stehen [15, 124, 250, 258, 349]. Dabei korreliert das Infektionsrisiko mit der Dauer der Katheterisierung, denn das Risiko steigt mit jedem Tag um 3 bis 10 % [166]. Eigenschaften des Urins, wie der pH-Wert, die Osmolalität und die Temperatur sowie das Vorhandensein von Nährstoffen, bieten den Mikroorganismen hervorragende Wachstumsbedingungen [267]. Eine Behandlung erfolgt erst mit dem Auftreten von Symptomen einer Blasen- oder Nierenentzündung [258, 381].

In 35 % der katheterassoziierten Harnwegsinfektionen ist das Gram-negative Stäbchen *Pseudomonas aeruginosa* involviert [172, 261]. Der ubiquitäre Mikroorganismus kann eine Vielzahl von Nährstoffquellen verwerten [117, 204]. Seine große Zahl an Virulenzfaktoren erhöht das Risiko einer Infektion und die hohe intrinsische Resistenz erschwert die Behandlung. Unter Selektionsdruck, wie er in der Lunge von Patienten mit Cystischer Fibrose oder in Biofilmen auftritt, bildet *P. aeruginosa* phänotypische Kolonievarianten [36, 157], die u. a. eine erhöhte Resistenz gegenüber Antibiotika aufweisen [90, 226]. Der nosokomiale Krankheitserreger ist aufgrund seiner bekannten physiologischen Vielseitigkeit und der Tatsache, dass

die Ausbildung eines Biofilms als Teil seines Lebenszyklusses betrachtet wird, ein hervorragender Modellorganismus für die Biofilmforschung [388].

Um die Bildung katheterassozierten Harnwegsinfektionen vermeiden zu können, ist es notwendig Kenntnisse über ihre Entwicklung, d. h. über die Biofilmbildung, zu gewinnen. Zu diesem Zweck ist ein Kultivierungssystem erforderlich, welches die Bedingungen eines infizierten katheterisierten Harnwegs widerspiegelt. Für die Entwicklung eines solchen Kultivierungssystems sind die Parameter, die einen katheterisierten Harnweg *in vivo* charakterisieren, zu definieren, um sie im Kultivierungssystem *in vitro* möglichst exakt nachzubilden. Diese Parameter umfassen u. a. die Zusammensetzung des Kultivierungsmediums, also des Urins, den damit einhergehenden pH-Wert sowie den, sich aus dem vom Menschen durchschnittlich produzierten Harnvolumen ergebenden, Volumenstrom im Katheter. Weiterhin sind das Material des Katheters und die Dauer der Katheterisierung von Bedeutung.

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Kultivierungssystem entspricht in all diesen Punkten den realen Bedingungen und ist daher als replikatives Reaktorsystem zu verstehen. Zur on-line Überwachung des Biofilmwachstums im *in vitro*-Harnwegskathetersystem kommt ein nicht-invasiver Sensor zum Einsatz, der optisch das Wachstum des Biofilms aufzeichnet und so eine Aussage zur spezifischen Biofilmwachstumsrate erlaubt.

In replikativen Systemen sollten klinisch relevante Organismen zum Einsatz kommen, daher werden drei *P. aeruginosa*-Isolate aus Harnwegs- und katheterassozierten Harnwegsinfektionen sowie ein Referenzstamm dieses uropathogenen Bakteriums als Modellorganismen verwendet. Die Isolate unterscheiden sich u. a. in ihrer Beweglichkeit, in ihrer Fähigkeit Biofilme auszubilden bzw. das extrazelluläre Polymer Alginate zu synthetisieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe des replikativen Kultivierungssystems folgende Fragestellungen zu beantworten.

- Charakterisierung des Biofilmwachstums

Hier gilt es zu klären, welche Parameter einen Biofilm charakterisieren und dies anhand biofilmspezifischer Eigenschaften der *P. aeruginosa*-Isolate sowie des Referenzstammes aufzuzeigen.

- Entwicklung phänotypischer Kolonievarianten

Im Fokus dieser Untersuchungen steht der Einfluss der Prozessparameter auf die Entstehung phänotypischer Kolonievvarianten von *P. aeruginosa* bei Biofilmkultivierungen.

- Behandlung katheterassoziierter Harnwegsinfektionen mit Ciprofloxacin

Die Simulation katheterassoziierter Harnwegsinfektionen unter Verwendung des *in vitro*-Harnwegskathetersystems ermöglicht es, die therapeutische Wirkung verschiedener Konzentrationen des Gyrasehemmers Ciprofloxacin auf Biofilme zu untersuchen und die Effektivität einer antibiotischen Therapie einzustufen.

- Auswirkung mechanischer Beanspruchung auf die Biofilmentwicklung

Ziel ist es, die Wirkung unterschiedlich starker mechanischer Beanspruchungen auf den Biofilm zu ermitteln und das mögliche Potential für den Einsatz zur Biofilmbehandlung herauszustellen.

- Erweiterung der Messtechnik

Um die Messung weiterer charakteristischer Biofilmparameter zu ermöglichen, werden am *in vitro*-Harnwegskathetersystem verschiedene Messtechniken erprobt und die Anwendung analytischer Methoden optimiert.

Die Ergebnisse sollen als Grundlage für die Entwicklung von Vermeidungsstrategien infektiöser Biofilme dienen, die unter Einsatz des replikativen Reaktorsystems erprobt werden.

2 Aktueller Stand der Forschung

2.1 Biofilme

Bakterien lassen sich planktonisch (einzelne suspendierte Zellen) oder als Biofilm kultivieren. Das bakterielle Wachstum als Biofilm wurde von Forschern lange Zeit vernachlässigt. Heute ist bekannt, dass es sich dabei um die dominante Wachstumsform mikrobiellen Lebens handelt [213], die 99 % aller Bakterien bevorzugen [89].

Biofilme stellen sessile mikrobielle Gemeinschaften dar, die eingebettet in eine extrazelluläre Matrix, an Oberflächen, Phasengrenzflächen oder aneinander adhärirt, leben [89]. Sie bilden dreidimensionale Strukturen bestehend aus Mikro- und Makrokolonien, die von offenen Kanälen durchzogen sind [75, 230]. Die in der Matrix immobilisierten Zellen (prokaryotische sowie eukaryotische) machen ca. 10 bis 25 % der Biomasse eines Biofilms aus [65]. Mit bis zu 98 % ist der Hauptbestandteil eines Biofilms jedoch Wasser [110], das gebunden an die Bestandteile der Matrix oder frei in den Poren und Kanälen vorkommt [111]. Bakterielle extrazelluläre polymere Substanzen (EPS), wie Polysaccharide, Proteine, Nukleinsäuren und Lipide, bilden die Matrix der Biofilme [109].

Der Wechsel von der planktonischen zur sessilen Lebensweise wird durch eine Vielzahl von Umweltfaktoren und physiologischen Gegebenheiten beeinflusst, wie z. B. der Zelldichte, der Verfügbarkeit von Nährstoffen oder dem zellulären Stress [266, 288, 321, 422]. Bakterien, die in Biofilmen wachsen, weisen gegenüber den planktonischen Mikroorganismen vor allem Veränderungen in der Physiologie, der Genexpression und in der Resistenz gegenüber Antibiotika auf [89, 266, 321, 322]. Die Vorteile des sessilen Wachstums liegen u. a. im Schutz vor antibakteriellen Chemikalien, Bakteriophagen, Austrocknung, Fluktuationen des pH-Werts als auch in der Bereitstellung von Mikronischen begründet [49, 89, 147, 298, 431, 436]. Diese Nischen ermöglichen die Ausbildung unterschiedlicher mikrobieller Phänotypen innerhalb eines Biofilms und stellen so die Grundlage zur Adaptation der dynamischen Gemeinschaft an variable Umweltbedingungen (z. B. Hydrodynamik und Nährstoffzufuhr) dar [127]. Dabei kommt es zur Ausbildung sogenannter Mikrokonsortien.

Die ubiquitären Biofilme sind an die scheinbar lebensfeindlichsten Biotope angepasst [93]. Sie sind in Lebensräumen wie heißen Quellen, tiefen geologischen Formationen, hypersalinen und sauren Seen sowie arktischen und heißen Wüsten zu finden [220,