

# Biofilm und seine potentielle Rolle in der Wundheilung

Steven L. Percival, Philip G. Bowler

Wounds 16 (7) 2004: 234-240

## Zusammenfassung

Der Begriff Biofilm beschreibt eine Gemeinschaft von Mikroorganismen, die innerhalb einer extrazellulären polymeren Matrix eingeschlossen sind und sich auf einer Grenzfläche ansammeln. Biofilm spielt eine bedeutende Rolle bei einer Vielzahl von Infektionen des Menschen. Wegen der Resistenz dieser Strukturen gegen eine Reihe von antimikrobiellen Substanzen und dem Immunsystem des Menschen ist es schwierig solche Krankheiten wirksam zu behandeln. Biofilm ist an 65 % der nosokomialen Infektionen beteiligt. Es wird geschätzt, dass die Behandlung von Biofilm assoziierten Infektionen in den USA jährlich Kosten in Höhe von über einer Milliarde Dollar verursacht. Akute und chronische Hautwunden sind anfällig für eine Entwicklung von Biofilm.

## Einführung

Traditionell untersuchen Mikrobiologen Bakterien in flüssigen Kulturmedien. In diesem Zustand existieren die Bakterien als frei schwimmende planktonische Zellen. Wie dem auch sei, die meisten Bakterien sind in ihren natürlichen Lebensräumen an einer Grenzfläche befestigt. Das Wachstum einer großen Anzahl von Bakterienzellen innerhalb einer dreidimensionalen Matrix, fest haftend an einer Grenzfläche, wird als Biofilm bezeichnet. Beim Menschen werden verschiedene Grenzflächen besiedelt, z.B. Haut, Zähne, der Respirationstrakt und die Darmschleimhaut.

Unter geeigneten Bedingungen können alle Bakterien einen Biofilm aufbauen. Die meisten Bakterienarten, die Infektion verursachen, gehören zur normalen Mikroflora des Menschen und bilden Biofilm an Stellen, wo sie als harmlose Kommensalen (Nahrungsnutznießer) existieren. In dieser Situation spielt der Biofilm eine schützende und nützliche Rolle. Zum Beispiel verhindert Biofilm in der Scheide die Kolonialisierung von exogenen Krankheitserregern, einem als Kolonialisierungsresistenz bekanntem Phänomen. Durch das Zusammentreffen von bestimmten endogenen und exogenen Faktoren kann die Mikrobenflora eines solchen "gesunden" Biofilms gestört werden und es entwickelt sich ein pathogener Biofilm. Dies führt z.B. zu Karies. Staphylokokken, die Mitglieder der normalen Mikroflora der Haut sind, bilden häufig Biofilm auf implantierten medizinischen Geräten, wie intravenöse Katheter, Hüft- und Knieprothesen. Ähnlich *Pseudomonas aeruginosa*, der regelmäßig Infektionen bei Verbrennungen und anderen Wunden verursacht.

## Warum kann Biofilm Probleme verursachen?

Es wird geschätzt, dass 65% der nosokomialen Infektionen mit Biofilm assoziiert sind, und die Therapie dieser Infektionen kostet in den USA jährlich mehr als eine Milliarde Dollar. Die Kosten für einen Hüft-Ersatz in Großbritannien liegen bei 33.500 Pfund, aber die durch eine nachfolgende Infektion verursachten Krankenhauskosten

können bei 330.000 Pfund liegen. Warum stellen mit Biofilm assoziierte Infektionen so ein Problem dar? Folgenden Faktoren sind dafür verantwortlich:

1. **Biofilm-Bakterien sind gegen das menschliche Immunsystem weniger anfällig und infolgedessen kann eine Biofilm assoziierte Infektion über einen längeren Zeitraum bestehen (d.h. Entwicklung von einer akuten zu einer chronischen Infektion).** Phagozytierende Zellen haben Schwierigkeiten bei der Phagozytose von Bakterien im Biofilm wegen antiphagozytärer Eigenschaften der Matrix. Bei Abwesenheit spezifischer Antikörper blockieren Polysaccharide des Biofilms auch die Komplementaktivierung. Wenn Antikörper anwesend sind, werden sie im allgemeinen durch die Polymermatrix uneffektiv. Es konnte nachgewiesen werden, dass Biofilm auch Chemotaxis und Degranulation von polymorphkernigen Neutrophilen und Makrophagen hemmt. Der Kontakt mit einer Grenzfläche löst die Expression einer Reihe von bakteriellen Enzymen aus, die die Bildung von klebrigen Polymeren katalysieren, die Kolonialisierung und deren Schutz fördern. Die Struktur des Biofilms erlaubt nur eine Reaktion des Immunsystems mit jenen Antigenen, die auf der äußeren Oberfläche des Biofilms zu finden sind, Antikörper und andere Serumproteine dringen nicht häufig in den Biofilm ein. Außerdem sind polymorphkernige Neutrophile unfähig, Bakterien die innerhalb einer komplexen Polymermatrix wachsen und an einer Grenzfläche befestigt sind, wirksam zu verschlingen. Dies veranlasst die polymorph kernigen Neutrophilen, große Mengen pro-inflammatorischer Enzyme und Zytokine freizusetzen und führt zu einer ständigen Inflammation und Zerstörung nahe gelegenen Gewebes (d.h. chronische Entzündungsreaktion). Bakterien, die sich innerhalb der Biofilmmatrix der Wunde befinden, sind sowohl gegen immunologische, als auch unspezifische Verteidigungsmechanismen des Körpers immun.
2. **Biofilme zeigen eine angeborene Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen und schützen so eingeschlossene Bakterien.** Die Gründe dafür sind nicht klar, aber es ist wahrscheinlich, dass antimikrobielle Substanzen leicht deaktiviert werden oder nicht in den Biofilm eindringen. Bakterien innerhalb des Biofilms sind bis zu 1.000 mal resistenter gegenüber antimikrobiellen Substanzen als in einer planktonische Phase (im Wasser schwebend).
3. **Biofilme erhöhen die Möglichkeit eines Gentransfers innerhalb und zwischen unterschiedlichen Bakterien.** Dies ist von Bedeutung, da Bakterien mit Antibiotikaresistenzen diese Gene auf benachbarte, anfällige Bakterien übertragen können. Auch konnten ein Gentransfer von avirulenten kommensalen (nahrungsnutznießenden) Organismen in hoch virulente Krankheitserreger beobachtet werden.

## **Antibiotikaresistenz**

Antibiotika werden genutzt um bakterielle Infektionen zu behandeln. Da sich die Bakterien mit einem Schutzfilm umgeben, sprechen mit Biofilm assoziierte Infektionen auf diese Form der Therapie nicht so leicht an. Nach Beseitigung dieses Schutzfilms sind die Bakterien auch wieder anfällig gegenüber Antibiotika und Bioziden. In einer Reihe von Untersuchungen sind die Ursachen, die zur Fähigkeit

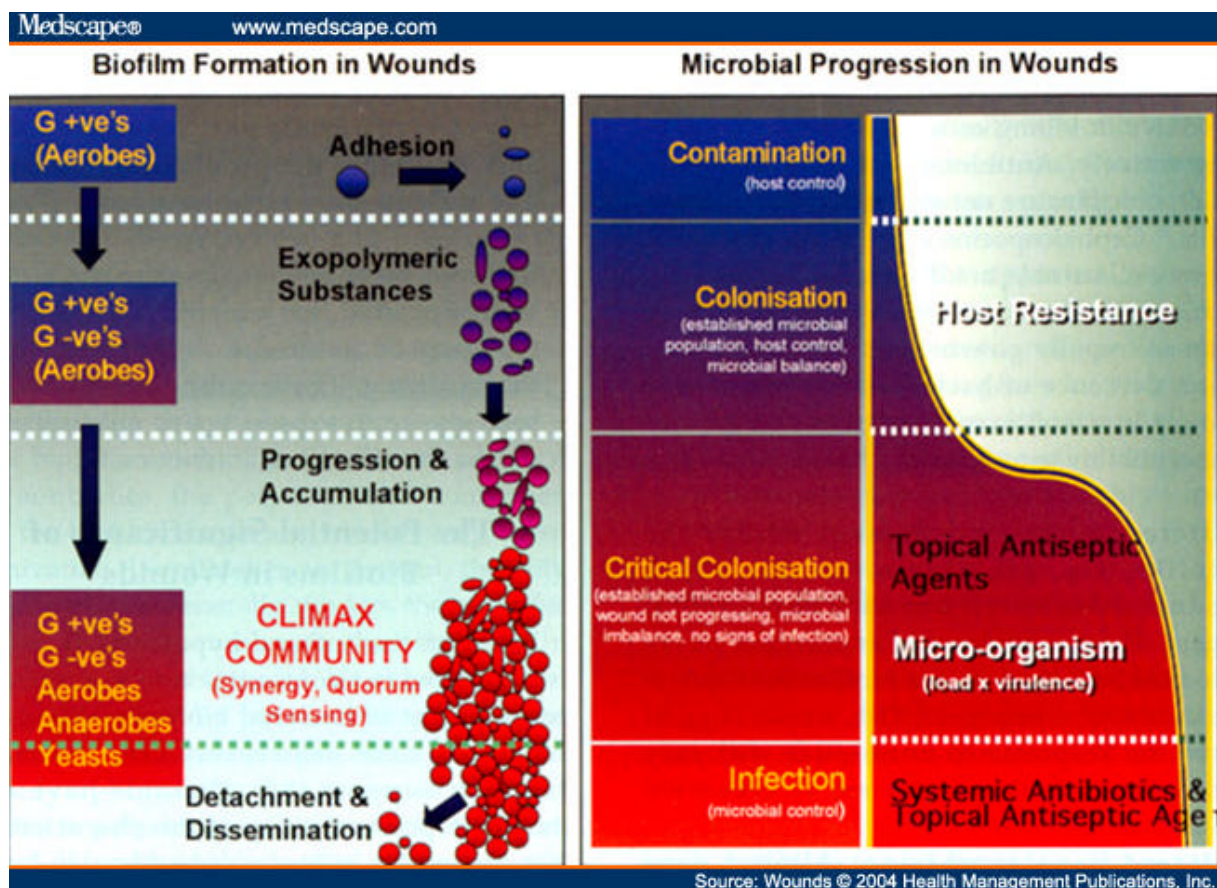
eines Biofilm beitragen, hohe Konzentrationen von Antibiotika zu tolerieren, zusammen getragen. Diese schließen ein:

1. **Verringerte Penetration eines Antibiotikums in die Biofilm-Matrix.** Viele Wissenschaftler erklären die unzureichende Antibiotika-/Biozid-Penetration als Biofilm-Resistenz. Antimikrobielle Substanzen reagieren entweder chemisch mit den extrazellulären Bestandteilen des Biofilms oder docken an anionische Polysaccharide an. Da die Matrix kein vollständig undurchdringliches Hindernis gegenüber antimikrobiellen Substanzen darstellt, müssen noch andere Mechanismen innerhalb des Biofilms existieren, die das bakterielle Überleben unterstützen.
2. **Reduzierte Wachstumsrate der Bakterien im Biofilm, die sie weniger anfällig für Antibiotika macht (sie verändern ihre physiologische Aktivität vom planktonischen zum anhaftenden Stadium im Biofilm).** Antibiotika sind gegenüber Bakterienzellen effektiver, wenn diese aktiv wachsen. Antibiotika, wie Ampicillin und Penicillin, besitzen nicht die Fähigkeit, nicht wachsende Zellen zu töten. Cephalosporin und Fluorochinolon besitzen die Eigenschaft, nicht wachsende Zellen zu töten, ihre Effizienz ist aber gegenüber schnell wachsenden und sich teilenden Zellen wesentlich höher. Deshalb trägt das langsame Wachstum der Bakterien im Biofilm zur reduzierten Anfälligkeit gegenüber Antibiotika bei.
3. **Das veränderte Mikromilieu innerhalb des Biofilms (z.B. pH-Wert, Sauerstoffgehalt) reduziert die Aktivität von antimikrobiellen Substanzen.** Es gibt Hinweise dafür, dass die Wirksamkeit einer antibiotischen Therapie in Beziehung steht zur physiologischen Aktivität in einem Biofilm. Die Reaktion der Antibiotika variiert in Abhängigkeit von der Lage spezifischer Zellen innerhalb des Ökosystems eines Biofilms.
4. **Veränderte Genexpression.** Durch veränderte Genexpression von Organismen innerhalb eines Biofilms oder einer allgemeinen Stressantwort des Biofilms wird auch die Anfälligkeit gegenüber Antibiotika reduziert.
5. **Quorum sensing (QS).** Als QS wird die Fähigkeit von Bakterien bezeichnet, miteinander zu kommunizieren. Sie erlaubt es den Zellen einer Suspension durch Autoinduktion die Zelldichte der Population zu messen und darauf zu reagieren. In einer Wunde leben viele Bakterien oft in dichten Populationen zusammen. QS ermöglicht diesen Bakterien, ihr Verhalten zu koordinieren und falls notwendig, zu verändern, um sich einer neuen Umgebung anzupassen. Angepasste Reaktionen von Bakterien innerhalb einer Wunde können in Beziehung stehen zur Verfügbarkeit von Nahrung, der Konkurrenz gegenüber anderen Mikroorganismen oder auch der Verhinderung von Angriffen des Immunsystems. Die Anpassung an das Wundmilieu über QS umfasst auch die Absonderung von schützenden Matrixsubstanzen und die Steigerung der Produktion von Enzymen, die eine Gewebsinvasion erleichtern.
6. **Spezifische Biofilm Phänotypen.** Es gibt Hinweise, dass spezifische Phänotypen als Subpopulationen des Biofilms existieren. Diese Subpopulationen sind mit aktiven Mechanismen zur Reduktion der Wirksamkeit von Antibiotika ausgerüstet.

## Die potentielle Bedeutung von Biofilm innerhalb von Wunden

Die Autoren vertreten die Hypothese, dass Wunden in der Lage sind, die Entwicklung bakteriellen Biofilms zu unterstützen, obwohl es dafür gegenwärtig nur sehr wenige klinische Beweise gibt. Wunden besitzen viele von den Merkmalen, die auf eine Existenz von Biofilm hinweisen. Serralta und Kollegen haben in einer Untersuchung nachgewiesen, dass Biofilm sich in Wunden bildet, und einen signifikanten Einfluss auf die Inflammation, Infektion und Heilung hat.

Wunden sind gegen mikrobielle Verunreinigungen aus exogenen und endogenen Quellen, einschließlich Nase, Haut, Mund und Darm anfällig. Die Entwicklung mikrobieller Gemeinschaften und ihre Veränderung innerhalb der Zeit ist an einem Wundmodell mit Vollhautdefekten beim Schwein demonstriert worden. In dieser Untersuchung fanden die Autoren, dass sich die Bakterienpopulation innerhalb der ersten sechs Tage von einer vorwiegend gram-positiven zu einer gram-negativen bakteriellen Besiedlung veränderte. Zwischen Tag 6 und 8 konnten Anaerobier festgestellt werden. Es ist wahrscheinlich, dass in menschlichen Hautwunden eine ähnliche mikrobielle Besiedlung erfolgt und Biofilm dabei eine wichtige Rolle spielt. Diese Besiedlung erfolgt in mehreren Phasen (Abb. 1) und wenn dieser Prozess nicht kontrolliert wird steigt die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer Infektion.



**Abb. 1:** Zusammenhang zwischen mikrobieller Besiedlung und Biofilmbildung in Wunden.

Eine frühe Besiedlung der Wundoberfläche entspricht meistens der der Hautflora (z.B. mit Staphylokokkus epidermidis). Das Bakterium haftet an der Wunde, vermehrt sich, produziert eine Polymermatrix und bildet einen "gesunden" Biofilm. An diesem

Punkt wird das Immunsystem aktiv und eine "Homöostase" bildet sich an der Stelle der Besiedlung. Es gibt Hinweise dafür, dass jetzt gram-negative Bakterien den Biofilm besiedeln, den verfügbaren Sauerstoff nutzen und Wachstumsfaktoren produzieren, die den Anaerobiern ermöglichen, sich innerhalb des Biofilm zu entwickeln. Es bildet sich eine komplexe, stabile polymikrobielle "climax community", auch häufig als "mikrobielle Homöostase" bezeichnet. Eine "climax community" ist eine Gemeinschaft von Mikroorganismen innerhalb eines quasi Fließgleichgewichts und unterstellt stabile Beziehungen zwischen deren Mitgliedern. Diese Situation wird mit dem Begriff "kritische Kolonisation" beschrieben. In dieser Phase beeinflussen die Mikroorganismen bereits den Wundheilungsprozess, ohne das klinische Infektionszeichen deutlich werden, obwohl es feine Anzeichen für eine bakterielle Unbalance gibt, wie z.B. Veränderungen in der Wundfarbe oder des Geruchs, zusammen mit der Anwesenheit von devitalisiertem Gewebe und einer Ischämie. In dieser Phase ist die Applikation eines antimikrobiellen Wirkstoffs mit einer breiten Wirkpalette angezeigt. Die gemeinsame Wirkung von antimikrobieller Substanz und der Immunantwort des Körpers verbessert die Bedingungen für die Wundheilung. Ohne Kontrolle der mikrobiellen Entwicklung erfolgt der Wechsel von einem frühen "gesunden" Biofilm zu einem "pathogenen" Biofilm bis hin zu einer klinischen Infektion. Wenn die pathogene Wirkung des Biofilms die Immunantwort des Gewebes übersteigt, stagniert die Wundheilung.