



*Poděkování:*

Ráda bych poděkovala RNDr. Petře Liškové, PhD. za její trpělivost, cenné rady a připomínky při vypracovávání této práce.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 22.7.2024

Podpis:



# Abstract

The bacterial genus *Mycobacterium* is an important genus belonging to the phylum *Actinobacteria*. It includes both saprophytic and obligatory parasitic species, such as *Mycobacterium tuberculosis*. The genus *Mycobacterium* has the ability to form biofilms. Biofilms are multicellular and three-dimensional communities of microorganisms that are encased in an extracellular matrix. Involved in its formation are glycopeptides, short-chain mycolic acids, monomeromycolyl diacylglycerol, biofilm-associated genes and chaperonins such as GroEL and isonitrile lipopeptide synthetase, Biofilms provide mycobacteria with significant resistance, for example to chemicals, protection, for example from the host immune system, and are the cause of antibiotic resistance. Biofilms are important pathogenicity factors in medicine due to the action of antibiotic resistance, but also due to the action of chronic infections, catheter and implant colonization, due to immunomodulatory effects, and also greatly complicate diagnosis by masking the presence of bacteria. The toxin-antitoxin system also plays a role in the antibiotic resistance of mycobacteria. Biofilms can be detected by many methods such as various microscopic methods such as confocal laser scanning microscopy, staining techniques such as cellulose staining, and even mass spectrophotometry.

Key words: *Mycobacterium*, biofilm, resistance, *Mycobacterium tuberculosis*, antibiotics, adhesion, nontuberculous mycobacteria

# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Charakteristika rodu <i>Mycobacterium</i> .....	2
2.1	Význam rodu <i>Mycobacterium</i> .....	2
2.2	Stavba buňky mykobakterií.....	4
2.2.1	Plazmatická membrána .....	4
2.2.2	Buněčná stěna.....	4
2.2.3	Pouzdro.....	5
3	Obecná definice biofilmu .....	6
4	Struktura biofilmu mykobakterií .....	7
4.1	Tvorba a růst biofilmu mykobakterií.....	8
4.1.1	Fáze tvorby biofilmu .....	8
4.2	Geny podmiňující tvorbu biofilmu.....	9
4.3	Role isonitrilové lipopetidové syntetázy při tvorbě biofilmu.....	10
5	Kultivační podmínky rodu <i>Mycobacterium</i> .....	11
6	Detekce biofilmu .....	14
7	Význam biofilmu.....	16
7.1	Mykobakteriální biofilmy v medicíně.....	16
7.1.1	Klinické důsledky.....	16
7.1.2	Terapeutické důsledky přítomnosti biofilmu v lidském organismu .....	18
7.2	Bakteriální rezistence u mykobakterií.....	19
7.2.1	Příčina rezistence.....	19
7.2.2	Testování citlivosti na léky.....	20
7.2.3	Toxin – antitoxin (TA) systém.....	20
7.2.4	Vztah mezi rezistencí a fitness v biofilmu .....	21
8	Závěr.....	23
9	Seznam použité literatury .....	24

# 1 Úvod

Bakteriální rod *Mycobacterium* je významný rod patřící do kmene *Aktinobacteria*. Do rodu *Mycobacterium* je zařazeno okolo 170 druhů, mezi kterými nalezneme enviromentální saprofytické mykobakterie, ale i bakterie obligátně parazitické, jako například *Mycobacterium tuberculosis* nebo *Mycobacterium leprae*. Mykobakterie disponují schopností tvorby biofilmu, který umožňuje výraznou odolnost vůči vlivům prostředí i vůči antimikrobiálním látkám, což je dělá velmi významnými patogenními faktory v medicíně.

V této práci jsou rozebírány charakteristické vlastnosti a význam rodu *Mycobacterium*, stavba cytoplazmatické membrány, buněčné stěny a pouzdra mykobakteriální buňky, které jsou důležitými faktory virulence. Dále je v práci rozebíraná charakteristika biofilmů, jejich struktura, dále tvorba a růst, kde jsou v kapitole rozebrány jednotlivé fáze tvorby a čím je tvorba biofilmu podmíněná. V práci jsou také popisovány kultivační podmínky jednotlivých mykobakteriálních druhů. V další kapitole jsou vyjmenovány a charakterizovány metody, jakými jsou biofilmy detekovatelné. V poslední, nejdelší kapitole, je rozebírán význam biofilmů v medicíně, kde je popisována tuberkulóza, jejímž původcem je *Mycobacterium tuberculosis*, a také onemocnění způsobená netuberkulozními mykobakteriemi. Biofilmy mají význam v medicíně hlavně z terapeutického hlediska, a to z důvodu způsobené antibiotické rezistence. V práci jsou rozebírány příčiny bakteriální rezistence i toxin – antitoxinový systém, mající na rezistenci významný podíl. V práci je také podkapitola věnovaná testování citlivosti na léky u rezistentních bakterií.







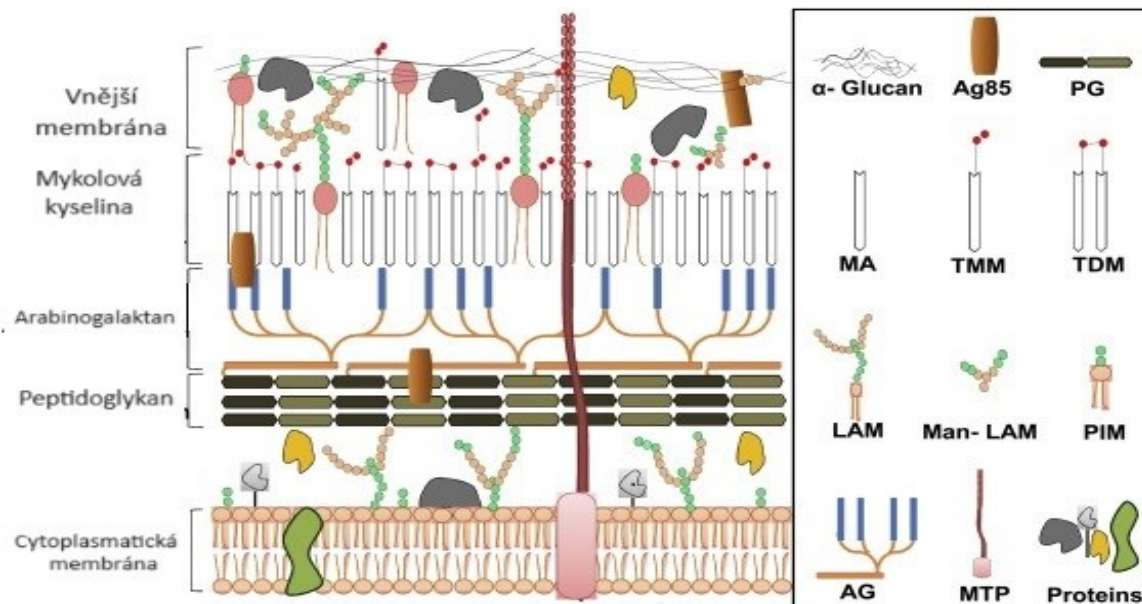
## 2.2 Stavba buňky mykobakterií

### 2.2.1 Plazmatická membrána

Pro stavbu mykobakterií je typická plazmatická membrána, složená z lipidů a sacharidů, jejíž stavba je podobná stavbě plazmatické membrány nejen u grampozitivních a gramnegativních bakterií, ale i u všech živých organismů. Je tvořena z polárních lipidů, které se skládají do dvojvrstvy. Lipidy jsou tvořeny z hydrofilních neboli polárních hlav, a jelikož obsahují fosfátovou skupinu, jsou nazývány také jako fosfolipidy. Mezi ně patří fosfatidylglycerol, kardiolipin a fosfatidylethanolamin a v malém množství i fosfatidilinositol (Ortalo-Magné, 1995). Dále jsou polární lipidy tvořeny z řetězců zbytků mastných kyselin s přímým řetězcem nebo nenasycených a mono-methyl rozvětvených zbytků mastných kyselin, které mají méně než dvacet uhlíků. Nejvýznamnějšími mastnými kyselinami jsou kyselina palmitová, olejová a 10-methyloktadekanoová, nazývaná také jako tuberkulostearová. Mohou zde být přítomny i další lipidy jako jsou menachinony (Minnikin, 1982).

### 2.2.2 Buněčná stěna

Buněčná stěna mykobakterií, nazývaná také jako mykomembrána, se svou stavbou liší od buněčných stěn grampozitivních a gramnegativních bakterií. Jak je vidět na Obr. 1, je to komplex tvořený dvojvrstvou vnější membrány, arabinogalaktanem a peptidoglykanem. Její tloušťka je mezi 7-8 nm, obsahuje kyselinu mykolovou, která tvoří vnitřní vrstvu buněčné stěny a je kovalentně spojen arabinogalaktanem, který je kovalentně spojen s peptidoglykanem. Kovalentní spoje vznikají prostřednictvím komplexního polymeru řazeným mezi A1 $\gamma$ , pro který je typické, že zůstane navázaný po odstranění nekovalentně vázaných látek na buněčnou stěnu. Vnější vrstvu buněčné stěny tvoří lipidy nekovalentně spojené s membránou. Mykomembrána je také bohatá na vosky, což znamená, že po obarvení odolává odbarvení okyselenými alkoholy i silnými minerálními kyselinami. Tato vlastnost se nazývá kyselinová-rezistence (Draper et al., 1987, Payeur, 2014, Chiaradia et al., 2017).



Obr. 1 Schematické znázornění buněčné stěny *Mycobacterium tuberculosis* (Vinod et al., 2020, upraveno)

### 2.2.3 Pouzdro

Složení pouzdra mykobakterií se liší v závislosti na jejich rychlosti růstu. U pomalu rostoucích druhů, jako je například patogenní *Mycobacterium tuberculosis*, je vnější vrstva pouzdra tvořena polysacharidy, kterými jsou  $\alpha$ -D-glukan, D-arabino-D-mannan a D-mannan. U rychle rostoucích druhů, jako je například *Mycobacterium smegmatis*, je vnější vrstva pouzdra složena převážně z proteinů. Vnější vrstva pouzdra je velmi zřídka tvořena lipidy, ty se nachází převážně v její vnitřní části. Těmito lipidy jsou fosfatidyl-myo-inositol mannosidy (PIM), diacyl trehalózy (DAT), ftiocerol dimycocerosáty (PDIM) a fosfatidylethanolamin (PE). Mezi mykobakteriálními druhy dochází k rozdílu ve složení a procentuálním zastoupení kapsulárních složek (Ortalo – Magne et al., 1995, Lemassu et al., 1996).

Polysacharidy pouzdra jsou důležitými faktory virulence a také rezistence mykobakterií. Důležitým imunogenním polysacharidem je arabinomannan. Zprostředkovává adhezi a průnik do hostitelských buněk, například u *M. tuberculosis* probíhá interakce mezi  $\alpha$ -glukanem a DC-SIGN receptory na dendritických buňkách, což umožňuje adhezi a následnou internalizaci (Geurtsen et al., 2009). Dále vylučují enzymy zapojené do detoxikace reaktivních meziproduktů kyslíku, jako je například peroxidáza a tím se podílejí na rezistenci vůči mikrobicidním mechanismům hostitele. V pouzdře byly také nalezeny toxické lipidy a kontaktně závislé lytické látky, které poškozují makrofágy a tím brání fagocytóze a dále zabraňují proliferaci lymfocytů (Stokes et al., 2004).



## 4 Struktura biofilmu mykobakterií

Biofilmy jsou mnohobuněčná a trojrozměrná společenstva mikroorganismů, která jsou obalená extracelulární matricí, kterou produkují buňky mikroorganismů. Extracelulární matrice je vysoce hydratovaná. Skládá se z vody, která je většinou složkou, a z extracelulárních polymerních substancí (EPS), kterými jsou extracelulární DNA (eDNA), bílkoviny, lipidy, zejména mykolyl-diacylglycerol, mykolové kyseliny a glykopeptidolipidy a polysacharidy, mezi které například u *M. tuberculosis* patří zejména celuloza (Flemming, Wingender, 2010\*, Trivedi et al., 2016).

Extracelulární matrice je nezbytná pro strukturální integritu, shlukování buněk (Lui et al., 2008), přilnavost k povrchům (Boks et al., 2008) a ochranu bakteriálního biofilmu, jelikož mu poskytuje značnou odolnost, a to jak chemickou, tak i mechanickou. Dále je nezbytná pro výživu biofilmu a jeho hydrataci (Aung et al., 2017).

Pokud se biofilm nachází ve tkáních hostitele, mohou zde být přítomny složky hostitelských tkání (Parsek, Singh, 2003\*).

Struktura biofilmu se mění během jeho dozrávání vlivem podmínek prostředí, ve kterém se nachází. Mezi tyto podmínky patří například charakter pohybu tekutin, podmínky růstu, fyzikálně chemické vlastnosti substrátu, dostupnost živin a podobně. Pro strukturu biofilmu jsou také typické vodní kanálky (Donlan, Costeron, 2002\*).

## 4.1 Tvorba a růst biofilmu mykobakterií

Tvorba biofilmů je faktorem patogenicity mykobakterií. Na jeho tvorbě se podílejí glykopeptidolipidy, mykolové kyseliny s krátkým řetězcem, monomeromykolyl diacylglycerol, geny podmiňující tvorbu biofilmu a chaperoniny, například GroEL, rozebírané v kapitole níže. Na regulaci tvorby biofilmu se podílejí živiny, ionty a zdroje uhlíku tím, že ovlivňují chování mykobakterií, například na úrovni katabolické represe (Carter et al., 2003, Ojha et al., 2005, Pacheco et al., 2013, Zeng et al., 2019). Glykopeptidolipidy byly popsány u všech druhů mykobakterií. Mají stejné složení lipopeptidového jádra, ale jinak se liší v glykosylaci, metylaci nebo acetylaci (Patterson et al., 2000).

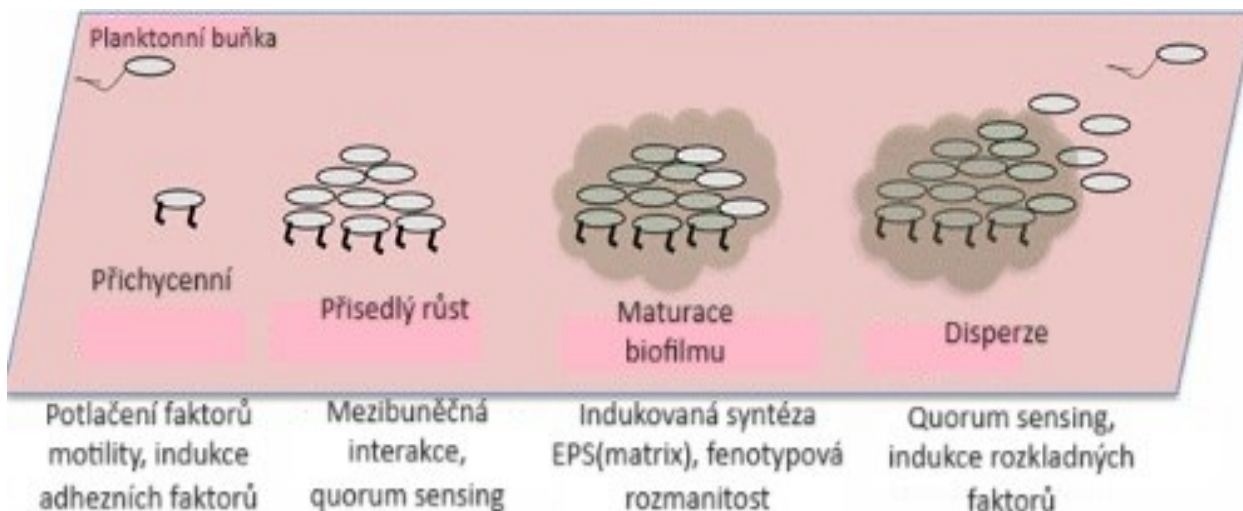
Biofilmy mykobakterií se příliš neliší od biofilmů jiných bakterií, ovšem některé mykobakterie jsou schopné tvořit biofilm na rozhraní vzduch-medium. Tato schopnost je dána složením buněčné stěny, která je odlišná od jiných bakterií a odlišným složením biofilmové extracelulární matrice (Ojha, 2015).

### 4.1.1 Fáze tvorby biofilmu

Tvorba biofilmu probíhá ve čtyřech fázích znázorněných na Obr. 2. První fází tvorby biofilmu je adheze mykobakterií k povrchu pomocí adhezínů. Adheziny jsou molekuly zprostředkovávající adhezi, přichycení k povrchu. Adheziny mohou mít různou chemickou povahu, včetně proteinů, lipidů, lipoproteinů, glykoproteinů a glykopolymerů (Vinod et al., 2020\*). Po adhezi k povrchu, začínají mykobakterie růst a následně produkovat extracelulární matici, která má za následek zrání biofilmu. Poslední fází je disperze, kdy se buňky z biofilmu uvolňují a kolonizují další povrchy. Jednotlivé mykobakterie spolu komunikují prostřednictvím quorum sensing (Menozzi, 1996, Waters et al., 2008). Quorum sensing je způsob komunikace mezi bakteriálními buňkami a probíhá prostřednictvím specifických signálních molekul, které buňky produkují do okolí a následně na ně reagují. Takovými molekulami jsou N-acylhomoserin laktony (AHL) (Park et al., 2006), autoinduktor peptidy (AIP), dále také deriváty  $\gamma$ -butyrolaktonu a methoxymykolové kyseliny (Polkade et al., 2016\*). Quorum sensing se účastní i druzí posli, například c-di-GMP (Gupta et al., 2010).

Adheze je klíčovým dějem při tvorbě biofilmu, a to ze tří důvodů. Za prvé, adheze planktonických bakterií k substrátu je bodem nukleace, což je první krok ve vývoji biofilmu. Druhým důvodem je, že během časného vývoje biofilmu je s největší pravděpodobností potřeba

mezibuněčná adheze. Za třetí, extracelulární matrice, která drží buňky v biofilmu pohromadě, vyžaduje pro udržení mechanické stability biofilmu adhezivní interakce (Tsuneda et al., 2003).



Obr. 2 Schematické znázornění jednotlivých vývojových stadií mikrobiálních biofilmů (Islam et al., 2012, upraveno)

## 4.2 Geny podmiňující tvorbu biofilmu

Mykobakterie jsou typické tím, že kódují chaperon GroEL, u kterého při evoluci došlo ke zdvojení, a tudíž kódují dva tyto chaperony a to GroEL1 a GroEL2. GroEL2 s největší pravděpodobností zajišťuje funkci housekeeping chaperonu GroEL. GroEL1 se spojuje s KasA, který je klíčovou složkou syntázy mastných kyselin typu II, která se podílí na syntéze kyseliny mykolové a tím je zajištěna syntéza mykolových kyselin C56-C68, které jsou důležité pro tvorbu biofilmu (Bhatt et al., 2005, Ojha et al., 2005, Noens et al., 2011).

Při studiích na *Mycobacterium smegmatis* byla potvrzena aktivita několika významných genů podmiňující tvorbu biofilmu. Prvním genem podmiňujícím tvorbu biofilmu je gen *mpe*, který kóduje tvorbu lipopeptidového jádra glykopeptidolipidu (GLP), který je klíčový pro počáteční tvorbu biofilmu. Expresi *mpe* mohou ovlivňovat například environmentální podmínky (Billman – Jacobs et al., 1999). Dalším genem kódujícím tvorbu lipopeptidového jádra GLP je *pks*. Expresi *pks* mohou regulovat různé transkripční faktory, signální dráhy a metabolické stavy, které reagují na změny v prostředí. Genem zodpovědným za přenos GLP na povrch mykobakterií je *gap*. Expresi *gap* mohou ovlivňovat metabolické potřeby buňky a různé environmentální podněty, kterými mohou být oxidační stres, teplotní

šok, hypoxie, nedostatek nebo nadbytek živin, které mění energetický stav buňky (Sondén et al., 2005, Joshi et al., 2024).

Studie Kundu et al., potvrzuje, že antigen MTC28 produkovaný *Mycobacterium tuberculosis* je důležitý pro tvorbu biofilmu a roli jeho  $\alpha 1\beta 1$  oblastí ve zvýšené tvorbě biofilmu a také ve vaznosti na buněčnou stěnu bakterie (Kundu et al., 2017).

Ve studii Chen et al., bylo potvrzeno, že gen *aceE* u *Mycobacterium smegmatis* se podílí na tvorbě pelikuly a biofilmu (Chen et al., 2020).

### 4.3 Role isonitrilové lipopetidové syntetázy při tvorbě biofilmu

Isonitrilová lipopetidová syntetáza, zkratkou INLP, je enzym, podílející se na biosyntéze isonitrilových lipopetidů, někdy označovaných pouze jako isonitrily. Je lokalizovaná uvnitř buněk jako součást biosyntetického aparátu. Enzym je lokalizován v cytoplasmě, kde katalyzuje syntézu isonitrilů. Geny kódující isonitrilovou lipopeptidovou syntetázu se nacházejí na chromozomu. Přítomnost isonitrilové lipopetidové syntetázy, produkující isonitrilové lipopeptidy, je typická pro mykobakteriální biofilmy, a je dokázáno, že isonitrilové lipopeptidy jsou nezbytné pro tvorbu a rozvoj biofilmu, jelikož umožňují adaptaci na prostředí a například u *M. tuberculosis* hrají roli v obraně proti imunitnímu systému hostitele. Isonitrilovou lipopeptidovou syntetázu je schopno syntetizovat pět kodujících biosyntetických enzymů mechanismem thio – templátu. Tvorba isonitrilu probíhá z prekurzoru glycinem podporovaného thioesterázou a homologem estrerázy, který je závislý na nehemovém železe a acylací obou aminoskupin lysinem stejným isonitrilovým acylovým řetězcem. Bylo prokázáno, že enzymy tvořící isonitril v patogenních mykobakteriích mají katalytickou funkci a jsou schopny rozpoznávat substrát. K virulenci a patogenitě mykobakterií INLP přispívá zprostředkováním transportu kovů. Inhibice enzymové aktivity INLP by mohla být strategií v boji proti mykobakteriálním patogenům. (Harris et al., 2017, Richards et al., 2019, Del Rio Flores et al., 2023).

## 5 Kultivační podmínky rodu *Mycobacterium*

Mykobakterie jako aerobní organismy, potřebují ke svému růstu prostředí s dostatečným množstvím kyslíku. V laboratorních podmínkách se hladina kyslíku udržuje na 20-21 %, což odpovídá koncentraci v atmosféře. Kultivace může být kvůli dlouhé generační době velmi zdlouhavá. Například u *M. tuberculosis* při kultivaci na Lowenstein-Jensenovu mediu, za aerobních podmínek, při 37 °C může generační doba činit až 22 hodin. Teploty optimální pro kultivaci mykobakterií mohou být u různých druhů velmi odlišné. Obecně nejvhodnějšími médii pro kultivaci mykobakterií jsou pevná média na bázi agaru a vajec, například Lowenstein-Jensenovo, Middlebrook 7H10 a 7H11 pevné médium a Petraganiho médium nebo média na bázi agaru a albuminu, která jsou oproti vaječným průhledná a umožňují dřívější zachycení růstu. Dále je používané Middlebrook 7HP tekuté médium, pro růst v baňkách, které je často obohaceno o glycerol, albumin nebo katalázu. Často je do médií přidávána i malachitová zeleň, která snižuje riziko kontaminace, jelikož působí antibakteriálně a antimykoticky, ale zároveň i zpomaluje růst mykobakterií. Riziko kontaminace je zde z několika důvodů. Za prvé, například u *M. tuberculosis*, zvyšuje riziko kontaminace dlouhá doba růstu, čímž mají delší expozici prostředí a kontaminace rychleji rostoucími organismy způsobí jejich přerostení. Za druhé, ve vzorcích odebraných z lidského těla, například sputum, se často nachází směs různých mikroorganismů a bez správné úpravy vzorku dojde k přerůstání nežádoucími mikroorganismy. Za třetí, při každé manipulaci se vzorky dochází k riziku zavlečení kontaminace z prostředí. Za čtvrté, i když všechna výše uvedená média jsou specifická pro růst mykobakterií a obsahují inhibitory pro růst jiných bakterií, tyto bakterie mohou být proti daným inhibitorům rezistentní (Kiehn, Cammarata, 1986, Eisenstadt, Hall, 1995, Zhu et al., 2020\*, De Lima et al., 2021).

*Mycobacterium tuberculosis* je striktně aerobní, pomalu rostoucí bakterie. Optimální teplota pro růst je mezi 35–37 °C po dobu 3–9 týdnů na pevných půdách, při kultivaci na tekutém mediu stačí obvykle 3 týdny (Amlerová et al., 2014).

*Mycobacterium smegmatis* je aerobní, rychle rostoucí bakterie, vyžadující inkubaci kolem 3-5 dnů. Optimální teplota pro růst je 37 °C (De Lima et al., 2021).

*Mycobacterium avium* je pomalu rostoucí a nejčastěji vyžaduje inkubaci po dobu osmi týdnů. Tvoří lehce pigmentované hladké kolonie, které mohou mít dvě podoby. Buď mohou být malé, tenké a průhledné anebo velké, neprůhledné a klenuté. Spodní teplotní hranice pro růst je 25 °C, optimální růst probíhá při 37 °C a začíná být nestálý při 45 °C (Parish, Kumar, 2021).





°C. Při teplotě 37 °C růst téměř nebo vůbec neprobíhá. Kolonie jsou bezbarvé a mohou být jak drsné, tak hladké (Sompolinksy et al., 1978).

*Mycobacterium gordonae*, známé také jako *Mycobacterium aquae*, tvoří oranžové kolonie vyžadující inkubaci po dobu čtyř až osmi týdnů při teplotách 25 °C nebo 37 °C (Woods, Wahington, 1987\*).

*Mycobacterium thermoresistibile* je typický schopností růst při teplotě 52 °C. Roste i při teplotách 25 °C, 37 °C a 45 °C, ale vyšší teplota je pro kultivaci lepší. Vyžaduje krátkou inkubaci po dobu sedmi dnů (Weitzman et al., 1981).

*Mycobacterium paratuberculosis* tvoří malé, bílé a lesklé kolonie. Vyžaduje inkubaci za optimální teploty 37 °C po dobu čtyř až osmi týdnů a přítomnost exogenního mykobaktinu, který chelatuje železo (Chiodini et al., 1984).

## 6 Detekce biofilmu

Při infekčních onemocnění spojených s tvorbou biofilmu nastává několik problémů s jeho detekcí. Diagnostické testy vycházejí často falešně negativní na přítomnost mikroorganismu, protože biofilmy mohou například zabránit přístupu činidel k buňkám nebo je mohou maskovat. Dále nalezené mikroorganismy mohou být nekultivovatelné nebo při kultivaci vzniká nízký počet kolonií, odebraný vzorek může být nevhodný, mikroorganismy nemají žádnou anebo mají velmi sníženou antimikrobiální citlivost, například k desinfekčním prostředkům. Dále jsou biofilmy velmi pružné, odolné a přilnavé, což komplikuje odběr vzorku pomocí stěrů pro následnou kultivaci, jelikož množství bakterií ve vzorku nemusí být dostačující (Aparna, Yadav, 2008).

Jednou z nejpoužívanějších metod pro detekci biofilmu je světelná mikroskopie. Je to levná, jednoduchá a pohodlná metoda. Pozorování světelným mikroskopem vyžaduje jasné, průhledné a rovinné povrchy. Nevytváří ale 3D zobrazení biofilmu. Pro zvýšení přehlednosti obrazu mikroorganismů lze použít barviva, například fluorescenční (Christensen et al., 2000).

Další metodou je detekce biofilmů pomocí barvení celulózy kalcofluorovou bělobou. Biofilmy na bázi celulózy tvoří například *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium avium* (Yamamoto et al., 2023).

Dále lze biofilm detekovat pomocí kombinace povrchové proteomiky k identifikaci proteinů vystavených povrchu mykobakteriálního biofilmu, jako je například chaperon GroEL2 (Hammarén et al., 2023).

Mykobakteriální biofilm a jeho ultrastruktury lze detekovat pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie (CLSM), čímž lze zkoumat trojrozměrná morfologie a fyziologie biofilmů (Kırmusaoglu, 2019\*).

Další metodou je detekce pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Viditelný obraz se vytváří na fluorescenčním stínítku svazkem elektronů, které prošly studovaným vzorkem, nebo které ve vzorku difraktovaly (Fassel et al., 2000).

K detekci biofilmu se také využívá měření hmotnostní spektrofotometrií, kterou lze detekovat a také charakterizovat biologické molekuly ve struktuře EPS. Existují dva druhy hmotnostní spektrofotometrie, kterými jsou ionizace elektrosprejem (ESI) a ionizace laserovou desorpcí s asistencí matrice (MALDI) (Shunmugaperumal, 2010).

Biofilm lze stanovit i molekulárními metodami, například metodou PCR, kterou lze detekovat faktory virulence pomocí amplifikace cílových genů virulence, jako jsou právě geny biofilmu, s použitím genově specifických primerů, a to i u nekultivovaného patogenu přítomného ve vzorku (Ahmad, 2023).

## 7 Význam biofilmu

Bakterie vytváří biofilmy jako mechanismus přežití, tudíž jsou všudypřítomné. Umožňují bakteriím přežít nepříznivé podmínky, jako je například působení chemických látek, vysoká teplota nebo vysoké pH. Mykobakterie v biofilmech hrají roli v rozkladu organických toxických látek (Pagnout et al, 2007).

### 7.1 Mykobakteriální biofilmy v medicíně

Mykobakteriální biofilmy jsou v medicíně považovány za důležité patogenní faktory při infekčních onemocněních. Během studií například *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium smegmatis* bylo prokázáno, že tvorba biofilmu zvyšuje antibiotickou rezistenci (Ojha et al., 2008). Výskyt multirezistentních a extrémně rezistentních kmenů mykobakterií se stále zvyšuje, zejména v souvislosti s HIV (World health organization, 2013).

#### 7.1.1 Klinické důsledky

##### 7.1.1.1 Onemocnění způsobená netuberkulózními druhy mykobakterií

Netuberkulózní druhy mykobakterií jsou klinicky významná, jelikož způsobují chronická onemocnění, nejčastěji chronická respirační onemocnění. Tato onemocnění jsou ve většině případech způsobena druhy *Mycobacterium avium complex* nebo *Mycobacterium abscessus*. Nejčastěji postihují pacienty například s cystickou fibrózou nebo pacienty, kteří dříve prodělali tuberkulózu nebo silikózu a mají v plicích různá zjizvení či dutiny, které jsou ideálním prostředím pro kolonizaci a následnou tvorbu biofilmu mykobakterií (Wolinsky, 1992, Churchyard et al., 1999, Olivier et al., 2003). Další onemocnění jako jsou bakteriémie nebo peritonitida způsobená netuberkulózními druhy mykobakterií byla zachycena u pacientů s dlouhodobě zavedenými katetry (Hawkins, 2008, Hakim et al. 1993), u pacientů s protetickými klouby nebo chlopněmi a kardiostimulátory. Léčba antibiotiky v těchto případech není dostačující a je nutné katetry a implantáty vyjmout (Bouchiat, 2015, Al-Ghamdi, 2016).

##### 7.1.1.2 Onemocnění způsobená *Mycobacterium tuberculosis*

Celosvětově nejznámějším onemocněním způsobené *Mycobacterium tuberculosis* je tuberkulóza. Podle statistik se tuberkulóza řadí mezi nejčastější příčiny úmrtí na světě. Ze statistiky z roku 2022 vyplývá, že v daném roce bylo po celém světě diagnostikováno 10,6 milionu případů a 1,3 milionu úmrtí. Jednou z příčin úmrtí na tuberkulózu je, že pacienti jsou socioekonomicky znevýhodnění, a proto se ke zdravotnické péči dostanou pozdě. Léčba je také

velmi zdoluhavá, trvá nejméně 6-9 měsíců a pacienti často léčbu nedokončí. Další příčinou úmrtí je, že *Mycobacterium tuberculosis* je často rezistentní vůči antibiotické léčbě (World health organization, 2023).

Průběh infekce *M. tuberculosis* je znázorněn na Obr. 3. V první fázi infekce dojde k setkání *M. tuberculosis* s alveolárními makrofágy (AM) v dýchacích cestách, ve kterých je vhodné prostředí pro usídlení a následný rozvoj infekce. Dále *M. tuberculosis* infikuje plicní epiteliální bunky, do jejichž membrán vylučuje virulenční lipidové faktory, jako jsou například ftiocerol dimykoserosát (PDIM) a sulfolipidy. Funkcí virulenčních lipidových faktorů je například modulace imunitní odpovědi. Infikované AM migrují do plicního intersticia. Migraci umožňuje sekreční systém ESX-1 *M. tuberculosis* a produkce IL-1 $\beta$  hostitelským imunitním systémem. Jakmile se *M. tuberculosis* dostane do plicního intersticia, infikuje další makrofágy. Neutrofile reagují na infekci *M. tuberculosis* produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) a neutrofilních extracelulárních pastí (NET), které způsobují zánět. K usmrcení *M. tuberculosis* makrofágy využívají antimikrobiální mechanismy, jako je autofagie, oxidační stres a fagolysozomální fúze, kterou má *M. tuberculosis* má schopnost inhibovat a tím v makrofágu intracelulárně přežít. Dále má *M. tuberculosis* schopnost detoxikace reaktivních forem kyslíku (ROS) pomocí katalázy-peroxidázy KatG a také inhibuje produkci ROS v makrofázích a neutrofilech pomocí NuoG. Když infikované makrofágy projdou apoptozou, mohou být odstraněny pomocí eferocytózy, která zamezuje šíření patogenu. *M. tuberculosis* využívá faktory virulence, jako jsou EsxA, CpnT a PDIM k indukci nekrózy a podpoře svého šíření. *M. tuberculosis* také indukuje tvorbu pěnových makrofágů tím, že zvyšuje akumulaci hostitelských lipidů, které podporují výživu a rezistenci bakterií. Hostitelské cytokiny, například interferony typu I a TNF (tummor necrosis factor) přispívají k zánětu tkání, který následně rekrutuje další buňky. Dále mykobakteriální EsxH potlačuje prezentaci antigenu dendritickými buňkami, čímž oddaluje reakci adaptivní imunity (Chandra et al., 2022).











mutací, delecí nebo duplikací, což umožňuje adaptaci na různé podmínky. Jak je výše zmíněno, rezistenci mykobakteriím umožňuje snížení metabolismu a růstové rychlosti jednotlivých buněk, tudíž v biofilmu budou přežívat buňky takto přizpůsobené. Mykobakterie pro přežití v nepříznivých podmínkách také využívají aktivaci specifické stresové odpovědi, jako je produkce stresových proteinů, které buňky chrání před poškozením (Richards et al., 2019, Wu et al., 2020, Xia et al., 2023).

## 8 Závěr

Tato bakalářská práce shrnuje současné poznatky o bakteriálním rodu *Mycobacterium*, o schopnosti tvorby biofilmu a významu mykobakteriálních biofilmů v medicíně, včetně antibiotické rezistence mykobakterií.

V současné době není stále zcela jasné, jak přesně *Mycobacterium tuberculosis* manipuluje imunitní odpověď hostitele. Například přesné mechanismy, které umožňují *M. tuberculosis* přežít v makrofázích, nejsou plně pochopeny. Tato nejasnost ztěžuje vývoj efektivních vakcín a terapeutik (Young et al., 2023\*).

Dále nejsou dostatečně prozkoumány mechanismy, které umožňují *Mycobacterium tuberculosis* přežít v latentním stavu v hostiteli, což komplikuje vývoj diagnostických metod a preventivních strategií (Salina et al., 2023\*).

U multirezistentních kmenů mykobakterií nejsou dostatečně zmapované genetické mutace spojené z rezistencí, což stěžuje vývoj léčiv. Výzkum tuberkulózy je také často nedostatečně financován ve srovnání s jinými infekčními nemocemi, jako jsou HIV a malárie. Nedostatečné financování omezuje pokrok ve vývoji nových diagnostických, terapeutických a preventivních metod (Khan et al., 2016\*).

Jedním z aktuálních směrů výzkumu u mykobakterií je výzkum zaměřený na diagnostické metody. Mezi tyto výzkumné metody patří Xpert MTB/RIF, který umožňuje rychlou detekci TB DNA a odolnosti vůči rifampicinu do dvou hodin. Tyto testy se osvědčily svou vysokou citlivostí a specifitostí, a to i při diagnóze extrapulmonální tuberkulózy (Biset et al., 2024).

Dalším z aktuálních směrů výzkumu je vývoj nových léků a terapeutických strategií je zaměřen na překonání multirezistentních mykobakterií. Jedním z přístupů je zlepšení penetračních gradientů léků, což má zabránit vzniku rezistence. Další směr zahrnuje vývoj vakcín a imunoterapií, které by mohly posílit imunitní odpověď hostitele (Bose et al., 2021\*).

Dále se výzkum zaměřuje na studium rolí různých imunitních receptorů, jako je CD36, které jsou zapojeny do regulace imunitní odpovědi na infekci *M. tuberculosis*. Tento receptor hraje roli v metabolismu lipidů a zánětlivých reakcích, což je klíčové pro pochopení patogeneze a vývoje potenciálních terapeutických cílů (Wang et al., 2024\*).

## 9 Seznam použité literatury

1. Ahmad, Pishtiwan. „PHENOTYPIC AND MOLECULAR DETECTION OF BIOFILM FORMATION IN METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATED FROM DIFFERENT CLINICAL SOURCE IN ERBIL CITY". *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 15, č. 1 (28. únor 2023): e2023016. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2023.016>.
2. Al-Ghamdi, Bandar, Hassan El Widaa, Maie Al Shahid, Mohammed Aladmawi, Jawaher Alotaibi, Aly Al Sanei, a Magid Halim. „Cardiac Implantable Electronic Device Infection Due to Mycobacterium Species: A Case Report and Review of the Literature". *BMC Research Notes* 9, č. 1 (prosinec 2016): 414. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2221-1>.
3. AMLEROVÁ, Jana, Pavel ČERMÁK, Jana SVOBODOVÁ, Vít ULMANN a Ilona ZEMANOVÁ. Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění: Národní standardní vyšetřovací postup [online]. [cit. 2024-06-14]. Dostupné z: [https://www.splm.cz/\\_download/0000016e-78d9-d7e2-a16e-7cffddf50000](https://www.splm.cz/_download/0000016e-78d9-d7e2-a16e-7cffddf50000)
4. Aparna, Madhu Sharma, a Sarita Yadav. „Biofilms: Microbes and Disease". *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 12, č. 6 (prosinec 2008): 526–30. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702008000600016>.
5. Aung, Thet Tun, Wei Hong Jeff Chor, Joey Kuok Hoong Yam, Michael Givskov, Liang Yang, a Roger W. Beuerman. „Discovery of Novel Antimycobacterial Drug Therapy in Biofilm of Pathogenic Nontuberculous Mycobacterial Keratitis". *The Ocular Surface* 15, č. 4 (říjen 2017): 770–83. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.06.002>.
6. Belton, Moerida, Sara Brilha, Roido Manavaki, Francesco Mauri, Kuldip Nijran, Young T Hong, Neva H Patel, et al. „Hypoxia and Tissue Destruction in Pulmonary TB". *Thorax* 71, č. 12 (prosinec 2016): 1145–53. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207402>.
7. Bhatt, Apoorva, Laurent Kremer, Annie Z. Dai, James C. Sacchettini, a William R. Jacobs. „Conditional Depletion of KasA, a Key Enzyme of Mycolic Acid Biosynthesis, Leads to Mycobacterial Cell Lysis". *Journal of Bacteriology* 187, č. 22 (15. listopad 2005): 7596–7606. <https://doi.org/10.1128/JB.187.22.7596-7606.2005>.
8. Billman-Jacobe, Helen, Malcolm J. McConville, Ruth E. Haites, Svetozar Kovacevic, a Ross L. Coppel. „Identification of a Peptide Synthetase Involved in the Biosynthesis

- of Glycopeptidolipids of Mycobacterium Smegmatis". *Molecular Microbiology* 33, č. 6 (září 1999): 1244–53. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01572.x>.
9. Biset, Sirak, Milto Teferi, Haylemesikel Alamirew, Biniyam Birhanu, Awoke Dessie, Abebe Aschale, Anmaw Haymanot, et al. „Trends of Mycobacterium Tuberculosis and Rifampicin Resistance in Northwest Ethiopia: Xpert® MTB/RIF Assay Results from 2015 to 2021". *BMC Infectious Diseases* 24, č. 1 (22. únor 2024): 238. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09135-0>.
  10. Boks, Niels P., Willem Norde, Henny C. Van Der Mei, a Henk J. Busscher. „Forces Involved in Bacterial Adhesion to Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces". *Microbiology* 154, č. 10 (1. říjen 2008): 3122–33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/018622-0>.
  11. \* Bose, Priyanka, Amit K. Harit, Ratnesh Das, Samaresh Sau, Arun K. Iyer, a Sushil K. Kashaw. „Tuberculosis: Current Scenario, Drug Targets, and Future Prospects". *Medicinal Chemistry Research* 30, č. 4 (duben 2021): 807–33. <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02691-5>.
  12. Bouchiat, Coralie, Julien Saison, Sandrine Boisset, Jean-Pierre Flandrois, Bertrand Issartel, Olivier Dauwalder, Yvonne Benito, et al. „Nontuberculous Mycobacteria: An Underestimated Cause of Bioprosthetic Valve Infective Endocarditis". *Open Forum Infectious Diseases* 2, č. 2 (1. duben 2015): ofv047. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv047>.
  13. CABALLERO, Benjamin. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Second edition. 2003 [cit. 2024-02-22]. ISBN 978-0-12-227055-0.
  14. Caldwell DE, Wolfaardt GM, Korber DR, Lawrence JR (1996 b). Cultivation of microbial communities and consortia. In: *Manual of environmental microbiology*. Washington, DC: ASM Press, pp. 1-10.
  15. \* Caldwell, Douglas E., Elijah Atuku, Darryl C. Wilkie, Kyle P. Wivcharuk, Subramanian Karthikeyan, Darren R. Korber, Dirk F. Schmid, a Gideon M. Wolfaardt. „Germ Theory Vs. Community Theory in Understanding and Controlling the Proliferation of Biofilms". *Advances in Dental Research* 11, č. 1 (duben 1997): 4–13. <https://doi.org/10.1177/08959374970110011501>.
  16. Carter, George, Martin Wu, Daryl C. Drummond, a Luiz E. Bermudez. „Characterization of Biofilm Formation by Clinical Isolates of Mycobacterium Avium". *Journal of Medical Microbiology* 52, č. 9 (1. září 2003): 747–52. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05224-0>.



25. Dailloux, M., M. Albert, C. Laurain, S. Andolfatto, A. Lozniewski, P. Hartemann, a L. Mathieu. „*Mycobacterium Xenopi* and Drinking Water Biofilms". *Applied and Environmental Microbiology* 69, č. 11 (listopad 2003): 6946–48.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6946-6948.2003>.
26. Dao-Thi, Minh-Hoa, Laurence Van Melderen, Erwin De Genst, Hassan Afif, Lieven Buts, Lode Wyns, a Remy Loris. „Molecular Basis of Gyrase Poisoning by the Addiction Toxin CcdB". *Journal of Molecular Biology* 348, č. 5 (květen 2005): 1091–1102. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.03.049>.
27. Duguid, Ian G., Elwyn Evans, Michael R. W. Brown, a Peter Gilbert. „Effect of Biofilm Culture upon the Susceptibility of *Staphylococcus Epidermidis* to Tobramycin". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 30, č. 6 (1992): 803–10.  
<https://doi.org/10.1093/jac/30.6.803>.
28. De Lima, Jaqueline Batista, Lana Patricia Da Silva Fonseca, Luciana Pereira Xavier, Barbarella De Matos Macchi, Juliana Silva Cassoli, Edilene Oliveira Da Silva, Rafael Borges Da Silva Valadares, José Luiz Martins Do Nascimento, Agenor Valadares Santos, a Chubert Bernardo Castro De Sena. „Culture of *Mycobacterium Smegmatis* in Different Carbon Sources to Induce In Vitro Cholesterol Consumption Leads to Alterations in the Host Cells after Infection: A Macrophage Proteomics Analysis". *Pathogens* 10, č. 6 (28. květen 2021): 662.  
<https://doi.org/10.3390/pathogens10060662>.
29. Del Rio Flores, Antonio, Maanasa Narayanamoorthy, Wenlong Cai, Rui Zhai, Siyue Yang, Yuanbo Shen, Kaushik Seshadri, Kyle De Matias, Zhaoqiang Xue, a Wenjun Zhang. „Biosynthesis of Isonitrile Lipopeptide Metallophores from Pathogenic *Mycobacteria*". *Biochemistry* 62, č. 3 (7. únor 2023): 824–34.  
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00611>.
30. \* Donlan, Rodney M., a J. William Costerton. „Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms". *Clinical Microbiology Reviews* 15, č. 2 (duben 2002): 167–93. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>.
31. Draper, P., O. Kandler, a A. Darbre. „Peptidoglycan and Arabinogalactan of *Mycobacterium Leprae*". *Microbiology* 133, č. 5 (1. květen 1987): 1187–94.  
<https://doi.org/10.1099/00221287-133-5-1187>.
32. Eisenstadt, J. „Microbiology and Classification of *Mycobacteria*". *Clinics in Dermatology* 13, č. 3 (červen 1995): 197–206. [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(95\)00021-7](https://doi.org/10.1016/0738-081X(95)00021-7).



33. \* Esteban, Jaime, a Marta García-Coca. „Mycobacterium Biofilms". *Frontiers in Microbiology* 8 (18. leden 2018): 2651. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02651>.
34. Falkinham, Joseph O., Cheryl D. Norton, a Mark W. LeChevallier. „Factors Influencing Numbers of *Mycobacterium Avium* , *Mycobacterium Intracellulare* , and Other Mycobacteria in Drinking Water Distribution Systems". *Applied and Environmental Microbiology* 67, č. 3 (březen 2001): 1225–31. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1225-1231.2001>.
35. Fassel, T.A., Edmiston, C.E. (2000). Evaluating Adherent Bacteria and Biofilm Using Electron Microscopy. In: An, Y.H., Friedman, R.J. (eds) *Handbook of Bacterial Adhesion*. Humana Press, Totowa, NJ. [https://doi.org/10.1007/978-1-59259-224-1\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-224-1_14)
36. \* Flemming, Hans-Curt, a Jost Wingender. „The Biofilm Matrix". *Nature Reviews Microbiology* 8, č. 9 (září 2010): 623–33. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
37. García-Coca, Marta, John-Jairo Aguilera-Correa, Arancha Ibáñez-Apestequía, Graciela Rodríguez-Sevilla, David Romera-García, Ignacio Mahillo-Fernández, Gabriel Reina, et al. „Non-Pigmented Rapidly Growing Mycobacteria Smooth and Rough Colony Phenotypes Pathogenicity Evaluated Using *in Vitro* and Experimental Models". *Pathogens and Disease* 77, č. 5 (1. červenec 2019): ftz051. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftz051>.
38. Gerdes, K., F.W. Bech, S.T. Jørgensen, A. Løbner-Olesen, P.B. Rasmussen, T. Atlung, L. Boe, O. Karlstrom, S. Molin, a K. Von Meyenburg. „Mechanism of Postsegregational Killing by the Hok Gene Product of the parB System of Plasmid R1 and Its Homology with the relF Gene Product of the E. Coli relB Operon." *The EMBO Journal* 5, č. 8 (srpen 1986): 2023–29. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04459.x>.
39. Geurtsen, Jeroen, Sunita Chedammi, Joram Mesters, Marlène Cot, Nicole N. Driessen, Tounkang Sambou, Ryo Kakutani, et al. „Identification of Mycobacterial  $\alpha$ -Glucan As a Novel Ligand for DC-SIGN: Involvement of Mycobacterial Capsular Polysaccharides in Host Immune Modulation". *The Journal of Immunology* 183, č. 8 (15. říjen 2009): 5221–31. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900768>.
40. Gochi, Mina, Noboru Takayanagi, Tetsu Kanauchi, Takashi Ishiguro, Tsutomu Yanagisawa, a Yutaka Sugita. „Retrospective Study of the Predictors of Mortality and Radiographic Deterioration in 782 Patients with Nodular/Bronchiectatic *Mycobacterium Avium* Complex Lung Disease". *BMJ Open* 5, č. 8 (srpen 2015): e008058. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-008058>.

41. Gupta, Kajal, Prasun Kumar, a Dipankar Chatterji. „Identification, Activity and Disulfide Connectivity of C-Di-GMP Regulating Proteins in Mycobacterium Tuberculosis". Editoval Niyaz Ahmed. *PLoS ONE* 5, č. 11 (30. listopad 2010): e15072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015072>.
42. Hakim, A., N. Hisam, a P. D. Reuman. „Environmental Mycobacterial Peritonitis Complicating Peritoneal Dialysis: Three Cases and Review". *Clinical Infectious Diseases* 16, č. 3 (1. březem 1993): 426–31. <https://doi.org/10.1093/clind/16.3.426>.
43. Hammarén, Milka Marjut, Hanna Luukinen, Alina Sillanpää, Kim Remans, Karine Lapouge, Tânia Custódio, Christian Löw, et al. „*In Vitro* and *Ex Vivo* Proteomics of *Mycobacterium Marinum* Biofilms and the Development of Biofilm-Binding Synthetic Nanobodies". Editoval Ileana M. Cristea. *mSystems* 8, č. 3 (29. červen 2023): e01073-22. <https://doi.org/10.1128/msystems.01073-22>.
44. Harris, Nicholas C., Michio Sato, Nicolaus A. Herman, Frederick Twigg, Wenlong Cai, Joyce Liu, Xuejun Zhu, et al. „Biosynthesis of Isonitrile Lipopeptides by Conserved Nonribosomal Peptide Synthetase Gene Clusters in Actinobacteria". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, č. 27 (3. červenec 2017): 7025–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705016114>.
45. Hawkins, Claudia, Chao Qi, John Warren, a Valentina Stosor. „Catheter-Related Bloodstream Infections Caused by Rapidly Growing Nontuberculous Mycobacteria: A Case Series Including Rare Species". *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 61, č. 2 (červen 2008): 187–91. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.01.004>.
46. Hoyle, Brian D., Clarence K. W. Wong, a J. William Costerton. „Disparate Efficacy of Tobramycin on Ca<sup>2+</sup> -, Mg<sup>2+</sup> -, and HEPES-Treated *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms". *Canadian Journal of Microbiology* 38, č. 11 (1. listopad 1992): 1214–18. <https://doi.org/10.1139/m92-201>.
47. Hazan, Ronen, Boaz Sat, Myriam Reches, a Hanna Engelberg-Kulka. „Postsegregational Killing Mediated by the P1 Phage “Addiction Module” *Phd-Doc* Requires the *Escherichia Coli* Programmed Cell Death System *mazEF*". *Journal of Bacteriology* 183, č. 6 (15. březem 2001): 2046–50. <https://doi.org/10.1128/JB.183.6.2046-2050.2001>.
48. Islam, Mohammad S, Jacob P Richards, a Anil K Ojha. „Targeting Drug Tolerance in Mycobacteria: A Perspective from Mycobacterial Biofilms". *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 10, č. 9 (září 2012): 1055–66. <https://doi.org/10.1586/eri.12.88>.

49. Jiang, Yong, Joe Pogliano, Donald R. Helinski, a Igor Konieczny. „ParE Toxin Encoded by the Broad-host-range Plasmid RK2 Is an Inhibitor of *Escherichia Coli* Gyrase". *Molecular Microbiology* 44, č. 4 (květen 2002): 971–79. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02921.x>.
50. Joshi, Hemant, Divya Kandari, Subhrangsu Sundar Maitra, Rakesh Bhatnagar, a Nirupama Banerjee. „Identification of genes associated with persistence in *Mycobacterium smegmatis*". *Frontiers in Microbiology* 15 (12. únor 2024): 1302883. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1302883>.
51. Khan, Saima, Firoz Ahmad, Mohd Ikram Ansari, Mohammad Ashfaque, Mohammad Hayatul Islam, a Mohd Khubaib. „Toxin-Antitoxin System of *Mycobacterium Tuberculosis*: Roles beyond Stress Sensor and Growth Regulator". *Tuberculosis* 143 (prosinec 2023): 102395. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2023.102395>.
52. Kiehn, T E, a R Cammarata. „Laboratory Diagnosis of Mycobacterial Infections in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome". *Journal of Clinical Microbiology* 24, č. 5 (listopad 1986): 708–11. <https://doi.org/10.1128/jcm.24.5.708-711.1986>.
53. \* Kırmusaoğlu, Sahra. „The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents". In *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*, editoval Sahra Kırmusaoğlu. IntechOpen, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84411>.
54. Korch, Shaleen B., Heidi Contreras, a Josephine E. Clark-Curtiss. „Three *Mycobacterium Tuberculosis* Rel Toxin-Antitoxin Modules Inhibit Mycobacterial Growth and Are Expressed in Infected Human Macrophages". *Journal of Bacteriology* 191, č. 5 (březen 2009): 1618–30. <https://doi.org/10.1128/JB.01318-08>.
55. Kostera, Joshua, Gregor Leckie, Klara Abravaya, a Hong Wang. „Performance of the Abbott RealTime MTB RIF/INH Resistance Assay When Used to Test Mycobacterium Tuberculosis Specimens from Bangladesh". *Infection and Drug Resistance* Volume 11 (květen 2018): 695–99. <https://doi.org/10.2147/IDR.S158953>.
56. Kundu, Prasun, Debabrata Dutta, a Amit Kumar Das. „The A1β1 Region Is Crucial for Biofilm Enhancement Activity of MTC 28 in *Mycobacterium Smegmatis*". *FEBS Letters* 591, č. 20 (říjen 2017): 3333–47. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12823>.
57. Lan, Nguyen Phu Huong, Marion-Eliëtte Kolader, Nguyen Van Dung, James I Campbell, Nguyen Thi Tham, Nguyen Van Vinh Chau, H Rogier Van Doorn, a Dien

- Hoa Le. „Mycobacterium Fortuitum Skin Infections after Subcutaneous Injections with Vietnamese Traditional Medicine: A Case Report". *BMC Infectious Diseases* 14, č. 1 (prosinec 2014): 550. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0550-z>.
58. Lemassu, Anne, Annick Ortalo-Magné, Fabienne Bardou, Gaby Silve, Marie-Antoinette Lanéelle, a Mamadou Daffé. „Extracellular and Surface-Exposed Polysaccharides of Non-Tuberculous Mycobacteria". *Microbiology* 142, č. 6 (1. červen 1996): 1513–20. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-6-1513>.
59. LeMieux, Julianna, a Graham Hatfull. „Set Phages to Kill: An Interview with Graham Hatfull, PhD". *PHAGE* 1, č. 1 (1. březen 2020): 4–9. <https://doi.org/10.1089/phage.2019.29000.int>.
60. Liu, Hui-Hui, Yi-Ran Yang, Xin-Cheng Shen, Zhi-Ling Zhang, Ping Shen, a Zhi-Xiong Xie. „Role of DNA in Bacterial Aggregation". *Current Microbiology* 57, č. 2 (srpen 2008): 139–44. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9166-0>.
61. Marks, J., P.A. Jenkins, a M. Tsukamura. „Mycobacterium Szulgai — A New Pathogen". *Tubercle* 53, č. 3 (září 1972): 210–14. [https://doi.org/10.1016/0041-3879\(72\)90018-9](https://doi.org/10.1016/0041-3879(72)90018-9).
62. Masson, A. M., a F. H. Prissick. „Cervical Lymphadenitis in Children Caused by Chromogenic Mycobacteria". *Canadian Medical Association Journal* 75, č. 10 (15. listopad 1956): 798–803.
63. Menozzi, F D, J H Rouse, M Alavi, M Laude-Sharp, J Muller, R Bischoff, M J Brennan, a C Locht. „Identification of a Heparin-Binding Hemagglutinin Present in Mycobacteria." *The Journal of Experimental Medicine* 184, č. 3 (1. září 1996): 993–1001. <https://doi.org/10.1084/jem.184.3.993>.
64. Mishal S. Khan, Helen Fletcher, a Richard Coker, London School of Hygiene and Tropical Medicine TB Centre Steering Committee, „Investments in Tuberculosis Research – What Are the Gaps?" *BMC Medicine* 14, č. 1 (prosinec 2016): 123, s12916-016-0644–0. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0644-0>.
65. Minnikin DE. 1982. Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles, p 95–184. In Ratledge C, Stanford J (ed), *The Biology of the Mycobacteria*, vol. 1. Physiology, Identification and Classification. Academic Press, London, UK.
66. Molina-Torres, Carmen Amelia, Oscar Noé Flores-Castillo, Irma Edith Carranza-Torres, Nancy Elena Guzmán-Delgado, Ezequiel Viveros-Valdez, Lucio Vera-Cabrera, Jorge Ocampo-Candiani, Julia Verde-Star, Jorge Castro-Garza, a Pilar Carranza-Rosales. „Ex Vivo Infection of Murine Precision-Cut Lung Tissue Slices with

- Mycobacterium Abscessus: A Model to Study Antimycobacterial Agents". *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 19, č. 1 (prosinec 2020): 52.  
<https://doi.org/10.1186/s12941-020-00399-3>.
67. Muhi, Stephen, Andrew H. Buultjens, Jessica L. Porter, Julia L. Marshall, Marcel Doerflinger, Sacha J. Pidot, Daniel P. O'Brien, et al. „Mycobacterium Ulcerans Challenge Strain Selection for a Buruli Ulcer Controlled Human Infection Model". Editoval Paul J. Converse. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 18, č. 5 (3. květen 2024): e0011979. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011979>.
68. Mustafa, Tehmina, Nils Anders Leversen, Lisbet Sviland, a Harald Gotten Wiker. „Differential in Vivo Expression of Mycobacterial Antigens in Mycobacterium Tuberculosisinfected Lungs and Lymph Node Tissues". *BMC Infectious Diseases* 14, č. 1 (prosinec 2014): 535. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-535>.
69. Naito, Maiko, Kentaro Fukushima, Shinsuke Kusakabe, Takaya Endo, Takayuki Shiroyama, Kika Ohira, Koji Azuma, et al. „Disseminated Non-Tuberculous Mycobacterial Infection Caused by Mycobacterium Obuense in an Immunocompromised Patient: A Case Report". *BMC Infectious Diseases* 23, č. 1 (8. srpen 2023): 517. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08510-7>.
70. Noens, Elke E, Chris Williams, Madhankumar Anandhakrishnan, Christian Poulsen, Matthias T Ehebauer, a Matthias Wilmanns. „Improved Mycobacterial Protein Production Using a Mycobacterium Smegmatis groEL1ΔCexpression Strain". *BMC Biotechnology* 11, č. 1 (prosinec 2011): 27. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-27>.
71. Nordén, Å., a F. Linell. „A New Type of Pathogenic Mycobacterium". *Nature* 168, č. 4280 (listopad 1951): 826–826. <https://doi.org/10.1038/168826a0>.
72. Ojha, Anil, Mridula Anand, Apoorva Bhatt, Laurent Kremer, William R. Jacobs, a Graham F. Hatfull. „GroEL1: A Dedicated Chaperone Involved in Mycolic Acid Biosynthesis during Biofilm Formation in Mycobacteria". *Cell* 123, č. 5 (prosinec 2005): 861–73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.012>.
73. Ojha, Anil K., Anthony D. Baughn, Dhinakaran Sambandan, Tsungda Hsu, Xavier Trivelli, Yann Guerardel, Anuradha Alahari, Laurent Kremer, William R. Jacobs, a Graham F. Hatfull. „Growth of Mycobacterium Tuberculosis Biofilms Containing Free Mycolic Acids and Harboring Drug-tolerant Bacteria". *Molecular Microbiology* 69, č. 1 (červenec 2008): 164–74. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06274.x>.
74. Ojha, Anil K., William R. Jacobs, a Graham F. Hatfull. „Genetic Dissection of Mycobacterial Biofilms". In *Mycobacteria Protocols*, editoval Tanya Parish a David

- M. Roberts, 1285:215–26. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2015. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2450-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2450-9_12).
75. Olivier, Kenneth N., David J. Weber, Richard J. Wallace, Ali R. Faiz, Ji-Hyun Lee, Yansheng Zhang, Barbara A. Brown-Elliott, et al. „Nontuberculous Mycobacteria: I: Multicenter Prevalence Study in Cystic Fibrosis". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167, č. 6 (15. březen 2003): 828–34. <https://doi.org/10.1164/rccm.200207-678OC>.
76. Ortalo-Magne, A., M.-A. Dupont, A. Lemassu, A. B. Andersen, P. Gounon, a D. Mamadou. „Molecular Composition of the Outermost Capsular Material of the Tubercle Bacillus". *Microbiology* 141, č. 7 (1. červenec 1995): 1609–20. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-7-1609>.
77. Pacheco, Sophia A., Fong-Fu Hsu, Katelyn M. Powers, a Georgiana E. Purdy. „MmpL11 Protein Transports Mycolic Acid-Containing Lipids to the Mycobacterial Cell Wall and Contributes to Biofilm Formation in Mycobacterium Smegmatis". *Journal of Biological Chemistry* 288, č. 33 (srpen 2013): 24213–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.473371>.
78. Pagnout, Christophe, Gilles Frache, Pascal Poupin, Benoît Maunit, Jean-François Muller, a Jean-François Férard. „Isolation and Characterization of a Gene Cluster Involved in PAH Degradation in Mycobacterium Sp. Strain SNP11: Expression in Mycobacterium Smegmatis Mc2155". *Research in Microbiology* 158, č. 2 (březen 2007): 175–86. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.11.002>.
79. Pandey, D. P. „Toxin-Antitoxin Loci Are Highly Abundant in Free-Living but Lost from Host-Associated Prokaryotes". *Nucleic Acids Research* 33, č. 3 (18. únor 2005): 966–76. <https://doi.org/10.1093/nar/gki201>.
80. Parish, Tanya, a Anuradha Kumar, ed. *Mycobacteria Protocols*. Roč. 2314. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer US, 2021. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1460-0>.
81. Park, Sun-Yang, Byung-Joon Hwang, Min-Ho Shin, Jung-Ae Kim, Ha-Kun Kim, a Jung-Kee Lee. „N -Acylhomoserine Lactonase Producing *Rhodococcus* Spp. with Different AHL-Degrading Activities". *FEMS Microbiology Letters* 261, č. 1 (srpen 2006): 102–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00336.x>.
82. \* Parsek, Matthew R., a Pradeep K. Singh. „Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis". *Annual Review of Microbiology* 57, č. 1 (říjen 2003): 677–701. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090720>.



92. Robinson, Richard T., a Anna R. Huppler. „The Goldilocks Model of Immune Symbiosis with Mycobacteria and Candida Colonizers". *Cytokine* 97 (září 2017): 49–65. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.05.015>.
93. Rogall, T., J. Wolters, T. Flohr, a E. C. Bottger. „Towards a Phylogeny and Definition of Species at the Molecular Level within the Genus Mycobacterium". *International Journal of Systematic Bacteriology* 40, č. 4 (1. říjen 1990): 323–30. <https://doi.org/10.1099/00207713-40-4-323>.
94. Runyon, Ernest H. „Anonymous Mycobacteria in Pulmonary Disease". *Medical Clinics of North America* 43, č. 1 (leden 1959): 273–90. [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)34193-1](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)34193-1).
95. Runyon, Ernest H. „Identification of Mycobacterial Pathogens Utilizing Colony Characteristics". *American Journal of Clinical Pathology* 54, č. 4 (1. říjen 1970): 578–86. <https://doi.org/10.1093/ajcp/54.4.578>.
96. \* Salina, Elena G. „Mycobacterium Tuberculosis Infection: Control and Treatment". *Microorganisms* 11, č. 4 (18. duben 2023): 1057. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041057>.
97. Schroder, K. H., a I. Juhlin. „Mycobacterium Malmoense Sp. Nov." *International Journal of Systematic Bacteriology* 27, č. 3 (1. červenec 1977): 241–46. <https://doi.org/10.1099/00207713-27-3-241>.
98. Shapiro, Howard M., a Thomas Hänscheid. „Fuchsin Fluorescence in Mycobacterium Tuberculosis: The Ziehl–Neelsen Stain in a New Light". *Journal of Microbiological Methods* 74, č. 2–3 (srpen 2008): 119–20. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.04.005>.
99. Shunmugaperumal T. *Biofilm Eradication and Prevention: A Pharmaceutical Approach to Medical Device Infections*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2010. pp. 116–151
100. Sompolinsky, D., A. Lagziel, D. Naveh, a T. Yankilevitz. „Mycobacterium Haemophilum Sp. Nov., a New Pathogen of Humans". *International Journal of Systematic Bacteriology* 28, č. 1 (1. leden 1978): 67–75. <https://doi.org/10.1099/00207713-28-1-67>.
101. Sondén, Berit, Dana Kocíncová, Caroline Deshayes, Daniel Euphrasie, Lamya Rhayat, Françoise Laval, Claude Frehel, Mamadou Daffé, Gilles Etienne, a Jean-Marc Reyrat. „Gap, a Mycobacterial Specific Integral Membrane Protein, Is Required for



- Glycolipid Transport to the Cell Surface". *Molecular Microbiology* 58, č. 2 (říjen 2005): 426–40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04847.x>.
102. Sripalakit, Pattana, Uthai Wichai, a Aurasorn Saraphanchotiwiththaya. „Biotransformation of Various Natural Sterols to Androstenones by *Mycobacterium* Sp. and Some Steroid-Converting Microbial Strains". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 41, č. 1–2 (červenec 2006): 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.04.007>.
103. Steed, Keesha A., a Joseph O. Falkinham. „Effect of Growth in Biofilms on Chlorine Susceptibility of *Mycobacterium Avium* and *Mycobacterium Intracellulare*". *Applied and Environmental Microbiology* 72, č. 6 (červen 2006): 4007–11. <https://doi.org/10.1128/AEM.02573-05>.
104. Stokes, Richard W., Raymond Norris-Jones, Donald E. Brooks, Terry J. Beveridge, Dan Doxsee, a Lisa M. Thorson. „The Glycan-Rich Outer Layer of the Cell Wall of *Mycobacterium Tuberculosis* Acts as an Antiphagocytic Capsule Limiting the Association of the Bacterium with Macrophages". *Infection and Immunity* 72, č. 10 (říjen 2004): 5676–86. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5676-5686.2004>.
105. Talwar, Sakshi, Manitosh Pandey, Chandresh Sharma, Rintu Kutum, Josephine Lum, Daniel Carbajo, Renu Goel, et al. „Role of VapBC12 Toxin-Antitoxin Locus in Cholesterol-Induced Mycobacterial Persistence". *editoVal Theodore M. Flynn. mSystems* 5, č. 6 (22. prosinec 2020): e00855-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00855-20>.
106. Tresse, O., T. Jouenne, a G.-A. Junter. „The Role of Oxygen Limitation in the Resistance of Agar-Entrapped, Sessile-like *Escherichia Coli* to Aminoglycoside and  $\beta$ -Lactam Antibiotics". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 36, č. 3 (1995): 521–26. <https://doi.org/10.1093/jac/36.3.521>.
107. Trivedi, Abhishek, Parminder Singh Mavi, Deepak Bhatt, a Ashwani Kumar. „Thiol Reductive Stress Induces Cellulose-Anchored Biofilm Formation in *Mycobacterium Tuberculosis*". *Nature Communications* 7, č. 1 (25. duben 2016): 11392. <https://doi.org/10.1038/ncomms11392>.
108. Tsuneda, Satoshi, Hirotoshi Aikawa, Hiroshi Hayashi, Atsushi Yuasa, a Akira Hirata. „Extracellular Polymeric Substances Responsible for Bacterial Adhesion onto Solid Surface". *FEMS Microbiology Letters* 223, č. 2 (červen 2003): 287–92. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00399-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00399-9).





*Frontiers in Microbiology* 10 (11. červen 2019): 1149.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01149>.

127. Zhang, Yonglong, Junjie Zhang, Klaus P Hoeflich, Mitsuhiko Ikura, Guoliang Qing, a Masayori Inouye. „MazF Cleaves Cellular mRNAs Specifically at ACA to Block Protein Synthesis in Escherichia Coli". *Molecular Cell* 12, č. 4 (říjen 2003): 913–23. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00402-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00402-7).
128. \* Zhu, Zhi, Jihong Jiang, a Yun Fa. „Overcoming the Biological Contamination in Microalgae and Cyanobacteria Mass Cultivations for Photosynthetic Biofuel Production". *Molecules* 25, č. 22 (10. listopad 2020): 5220. <https://doi.org/10.3390/molecules25225220>.
129. Zweijpfenning, Sanne, Stephan Kops, Cecile Magis-Escurra, Martin J. Boeree, Jakko Van Ingen, a Wouter Hoefsloot. „Treatment and Outcome of Non-Tuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease in a Predominantly Fibro-Cavitary Disease Cohort". *Respiratory Medicine* 131 (říjen 2017): 220–24. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.08.031>.

\*sekundární citace