

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Biofilmy a lidské tělo

Výskyt producentů biofilmu na centrálních žilních katétrech a vliv xanthohumolu na biofilm vybraných klinických izolátů

Adéla Chlupáčová

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Konzultant: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji PharmDr. Petru Jílkovi, CSc., vedoucímu mé diplomové práce, za jeho cenné rady, pomoc, ochotu a čas během psaní této práce. Stejně tak bych chtěla poděkovat doc. MUDr. Pavlu Čermákovi, CSc., primáři Oddělení klinické mikrobiologie Thomayerovy nemocnice v Praze, že mi umožnil vypracovat experimentální část práce na svém oddělení a povolil zpracovat jejich výsledky laboratorních vyšetření. Velice děkuji za jeho vedení při práci, trpělivost, ochotu, čas a pro mne jedinečnou příležitost. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Vladimíru Klabanovi za inspiraci, jeho nadšení pro věc a konzultaci tématu. V neposlední řadě děkuji mé rodině a blízkým za podporu během celého studia.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 25. dubna 2018

.....

Adéla Chlupáčová

Obsah

1	Abstrakt.....	6
2	Abstract.....	8
3	Použité symboly a zkratky.....	10
4	Úvod.....	12
5	Zadání a cíl práce	15
6	Teoretická část	16
6.1	Obecná charakteristika biofilmu.....	16
6.1.1	Historické aspekty	16
6.1.2	Metody výzkumu biofilmu	17
6.1.2.1	Vývoj experimentálních metod.....	17
6.1.2.2	Diagnostika biofilmu v humánní medicíně	19
6.2	Stavba biofilmu	20
6.2.1	Stádia tvorby biofilmu.....	20
6.2.2	Jednotlivé složky biofilmu	22
6.2.2.1	Seskupení mikroorganismů a matrix	22
6.2.2.2	Signální systémy.....	24
6.3	Ochrana mikroorganismů uvnitř biofilmu	24
6.3.1	Odolnost biofilmu vůči imunitnímu systému hostitele.....	24
6.3.1.1	Biofilm a imunitní systém	24
6.3.1.2	Obrana hostitele proti biofilmu	25
6.3.2	Odolnost vůči antibiotické léčbě.....	26
6.4	Patogenní biofilm.....	27
6.4.1	Patogenní mikroorganismy tvořící biofilmy	27
6.4.2	Choroby jako důsledek tvorby biofilmu	31
6.4.2.1	Cystická fibróza	33
6.4.2.2	Endokarditida.....	33
6.4.2.3	Bércové vředy a diabetická noha.....	34
6.4.2.4	Vaginální biofilm	36
6.4.2.5	Zubní plak.....	37
6.4.2.6	Otitida	38
6.4.2.7	Osteomyelitida.....	38
6.4.2.8	Rhinosinusitida.....	39
6.4.2.9	Tuberkulóza	39
6.4.3	Tvorba biofilmu na katétrech, implantátech a dalších zdravotnických prostředcích.....	39
6.5	Profylaxe a léčba chorob spojených s biofilmy.....	41
6.5.1	Principy potlačení tvorby biofilmu.....	41
6.5.2	Terapeutické postupy již používané v praxi	44
6.5.3	Terapeutické postupy u konkrétních chorob spojených s biofilmy	46
6.5.3.1	Cystická fibróza	46
6.5.3.2	Vaginální biofilm	47
6.5.3.3	Zubní plak.....	48
6.5.4	Užití nanočástic kovů v potlačení tvorby biofilmu	49
6.5.5	Substance proti biofilmu na bázi peptidů	50
6.5.6	Vliv na biofilm jiných registrovaných léčiv než ATB	51
6.5.7	Přírodní látky ovlivňující biofilm.....	52
6.5.7.1	Chmel a jeho účinky na biofilm.....	52
6.5.8	Vliv živých mikroorganismů	54
6.5.9	Ochrana zdravotnických prostředků.....	54

6.6	Biofilmy v přírodním prostředí a využití biofilmu v biotechnologických procesech.....	56
6.6.1	Biofilmy v přírodním prostředí.....	56
6.6.2	Využití biofilmu v biotechnologických procesech.....	58
7	Experimentální část.....	60
7.1	Hodnocení záznamů o nálezech na centrálních žilních katétrech.....	60
7.1.1	Metodika a materiál.....	60
7.1.2	Zpracování výsledků.....	61
7.2	Stanovení účinku xanthohumolu na biofilm.....	61
7.2.1	Materiál.....	61
7.2.1.1	Testovací mikroorganismy.....	61
7.2.1.2	Testovaná látka.....	62
7.2.1.3	Další materiál.....	62
7.2.2	Pracovní postup.....	62
7.2.2.1	Průkaz tvorby biofilmu různých bakterií.....	62
7.2.2.2	Stanovení minimální inhibiční koncentrace, minimální mikrobicidní koncentrace a sledování potlačení růstu biofilmu.....	63
7.2.2.3	Sledování potlačení uvolňování bakterií z biofilmu a schopnost průniku xanthohumolu do biofilmu.....	63
7.2.3	Zpracování výsledků.....	63
8	Výsledky.....	64
8.1	Vyhodnocení vyšetření producentů biofilmu na centrálních žilních katétrech.....	64
8.2	Účinky xanthohumolu na biofilm.....	83
8.2.1	Průkaz tvorby biofilmu různých bakterií.....	83
8.2.2	Stanovení minimální inhibiční koncentrace, minimální baktericidní koncentrace a sledování potlačení růstu biofilmu.....	85
8.2.3	Sledování potlačení uvolňování bakterií z biofilmu a schopnost průniku xanthohumolu do biofilmu.....	86
8.2.3.1	Potlačení uvolňování planktonických bakterií z biofilmu.....	86
8.2.3.2	Potlačení uvolňování planktonických bakterií z biofilmu kvantitativně.....	86
8.2.3.3	Koncentrace XTH pronikající do biofilmu a tím potlačující další uvolňování planktonických bakterií z biofilmu.....	89
9	Diskuse.....	90
9.1	Vyhodnocení nálezů producentů biofilmu na centrálních žilních katétrech.....	90
9.2	Účinky xanthohumolu na biofilm.....	92
10	Závěr.....	96
11	Seznam tabulek.....	97
12	Seznam grafů.....	97
13	Seznam obrázků.....	98
14	Použitá literatura.....	99
15	Internetové zdroje.....	107

1 ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Autor: Adéla Chlupáčová

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Odborný školitel: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.

Název práce: Biofilmy a lidské tělo

Podtitul: Výskyt producentů biofilmu na centrálních žilních katétrech a vliv xanthohumolu na biofilm vybraných klinických izolátů

Cíl práce: Cílem práce bylo znázornit četnost výskytu biofilmu na katétrech, který vede k závažným zdravotním komplikacím. Ve druhé části práce jsme zjišťovali, jak odolný je biofilm tvořený běžnými původci biofilmu, jako je *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*, vůči přírodním látkám, konkrétně xanthohumolu.

Metody: Část práce sledující výskyt producentů biofilmu na katétrech byla zpracována pomocí tabulek a grafů v programu Microsoft Excel. K testování xanthohumolu byly použity laboratorní techniky jako barvení biofilmů na mikrotitrační destičce krystalovou violetí, stanovení minimální inhibiční koncentrace pomocí mikrodiluční metody, minimální baktericidní koncentrace byla stanovena na Columbia krevním agaru, potlačení uvolňování bakterií z biofilmu bylo sledované na mikrotitračních destičkách za působení xanthohumolu ve dvojkovém ředění.

Výsledky: Během sledovaných pěti let klesá počet producentů biofilmu na katétrech. Stejně tak sledujeme klesající různorodost mikroorganismů schopných tvořit biofilm. Nejčastějším producentem na centrálních žilních katétrech je *Staphylococcus aureus*. Xanthohumol potlačuje růst planktonických bakterií i uvolňování planktonických bakterií z biofilmu. Koncentrace ovlivňující biofilm je vyšší než koncentrace potlačující volně žijící bakterie. Enterokoky vykazují pod vlivem xanthohumolu vyšší nepředvídatelnost než stafylokoky.

Závěry: Bakterie produkující biofilm jsou častou komplikací zdravotního stavu člověka, nicméně se zdá, že se zlepšující se zdravotnickou péčí se daří výskyt těchto komplikací

potlačit. Xanthohumol v nízkých koncentracích inhibuje růst patogenních mikroorganismů. Ve vyšších koncentracích ovlivňuje uvolňování bakterií z biofilmu, což může omezit šíření patogenů v organismu.

2 ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Author: Adéla Chlupáčová

Supervisor: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Supervisor specialist: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.

Title of Diploma thesis: Biofilms and human body

Subtitle: The occurrence of biofilm producers on central venous catheters and the effect of xanthohumol on the biofilm of selected clinical isolates

Background: The aim of the work was to show the frequency of appearance of biofilm on the catheters, which leads to serious health complications. In the second part of the thesis we investigated the biofilm resistance of common biofilm agents such as *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* to natural substances, namely xanthohumol.

Methods: Part of the thesis which monitors the occurrence of biofilm producers on catheters was processed using tables and charts in Microsoft Excel. To testing xanthohumol were used laboratory techniques such biofilm staining with crystal violet in microtiter plate, the minimal inhibitory concentrations of xanthohumol were determined using the broth microdilution method, the minimal bactericidal concentrations were determined on Columbia blood agar, inhibition of bacterial release from biofilm was monitored in microtiter plates with xanthohumol using a twofold dilution system.

Results: During the monitored five years the number of biofilm producers on catheters decreases. We also monitor the decreasing diversity of microorganisms capable of forming biofilm. The most common producer on central venous catheters is *Staphylococcus aureus*. Xanthohumol inhibits the growth of planktonic bacteria and the release of planktonic bacteria from biofilm. The concentration influencing the biofilm is higher than the concentration suppressing planktonic bacteria. Enterococci exhibit higher unpredictability than staphylococci under the influence of xanthohumol.

Conclusions: Bacteria producing biofilms are a frequent complication of human health, however, it seems that improving health care is successful in suppressing the occurrence of these complications. Xanthohumol inhibits the growth of pathogenic microorganisms at low concentrations. At higher concentrations it affects the release of bacteria from the biofilm, which can reduce the spread of pathogens in the organism.

3 POUŽITÉ SYMBOLY A ZKRATKY

ALT	technika zámku (antimicrobial lock technique)
ATB	antibiotika
ARGs	geny pro rezistenci na antibiotika (antibiotic resistance genes)
ARO	anesteziologicko-resuscitační oddělení
BHI	mozkosrdcová infúze (brain heart infusion)
CFU	jednotky tvořící kolonie (colony forming units)
CF	cystická fibróza
CFTR	membránový přenašeč typu chloridového kanálu (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CŽK	centrální žilní katétr
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DNáza	deoxyribonukleáza
EPC	extracelulární ve vodě nerozpustný endoteliální polysacharid
FEV ₁	jednovteřinová vitální kapacita plic
FISH	fluorescenční hybridizace in situ
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicillin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (methicillin resistant <i>S. aureus</i>)
NSAID	nesteroidní antiflogistika
Pel	polysacharid tvořící pelikulu na povrchu biofilmu (pellicle)
PIA	polysacharidový mezibuněčný antigen (polysaccharide intercellular antigen)
PK-	plasmakoaguláza negativní
Psl	operon kódující syntézu polysacharidu (polysaccharide synthesis locus)
QS	quorum sensing
RR	odezvu regulující protein (response regulator protein)
XTH	xanthohumol

KLÍČOVÁ SLOVA

Biofilm, katétr, mikroorganismus, xanthohumol

4 ÚVOD

Povlak na povrchu zubu, sliz na dně potoka nebo nárůst na kořenech rostlin. Představy lidí o biofilmu se mohou lišit, podstata je však neměnná.

Costerton s kolektivem definovali biofilm jako strukturované společenství bakteriálních buněk umístěné v polymerní matrix, kterou bakterie sami vyprodukovaly, a přichycené na živý či neživý povrch (Costerton, Stewart et al. 1999). Elder s kolegy vymezil biofilm z pohledu kooperace jako funkční konsorcium mikroorganismů uvnitř exopolymerní matrix. Základem biofilmu je tedy společenství mikrobů, glykokalyx a povrch, na který mikroby přisedají (Elder, Stapleton et al. 1995).

Definici biofilmu v klinickém prostředí doplnil Hall-Stoodley s kolektivem v roce 2012. Nově pozměněná definice říká, že pojem biofilm zahrnuje agregované mikrobiální buňky obklopené polymerní, osobně vyprodukovanou matrix, která může obsahovat komponenty hostitele. Mikroorganismy často využívají k přisedání a tvorbě biofilmu součásti hostitelského organismu. Příkladem mohou být zubní plaky, kde mikroorganismy potřebují proteiny ze slin k přisedání na povrch zubu. Jiné bakterie se mohou vázat na povrch implantátu pomocí fibronektinu. Endokarditidu způsobují mikroorganismy propletením s fibrinem hostitele (Hall-Stoodley, Stoodley et al. 2012).

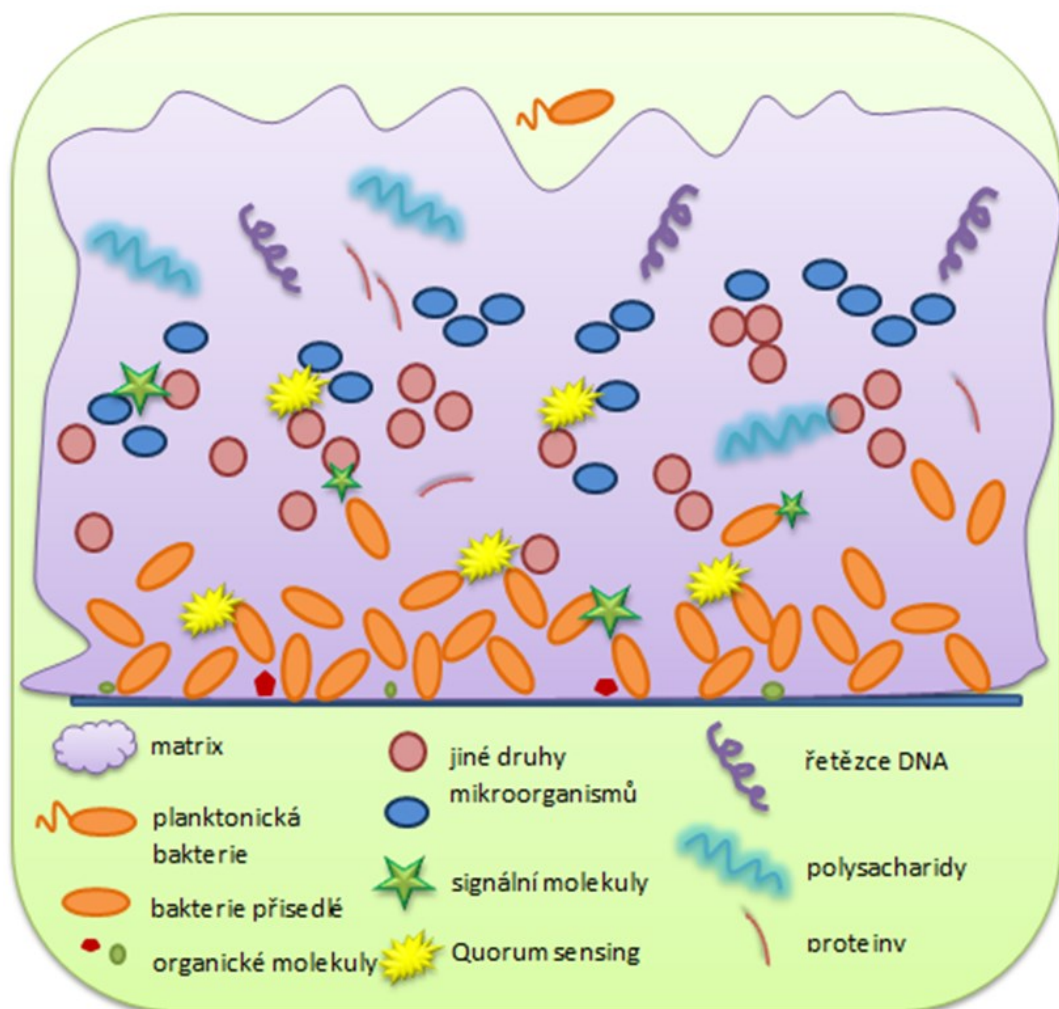
Biofilm je společenství mikroorganismů, které se tvoří na přírodních i syntetických podkladech za rozličných podmínek. Jsou studovány biofilmy uvnitř lidského těla na orgánech, tkáních a umělých katétrech, ve vodním prostředí i jinde v přírodě. Jedná se o útvar heterogenní, tvořený různými druhy organismů a dutinek. Buňky se shlukují do mikrokolonií a jsou doplňovány vyprodukovanými polysacharidy, proteiny a nukleovými kyselinami, tzv. matrix. Biofilm představuje nejběžnější životní styl mnoha mikroorganismů (Wakeman, Moore et al. 2016).

Biofilm vytváří bakterie gramnegativní i grampozitivní, dále kvasinky i větší organismy, jako jsou prvoci. Sloučením získávají mikroby odlišné vlastnosti, než mají volně žijící mikroorganismy. Mikrobiální buňky tvořící biofilm jsou chráněny proti vnějším vlivům, bakteriofágům, parazitům, imunitnímu systému hostitele a také proti dezinfekčním a léčivým přípravkům. Látky z vnějšího prostředí se dostanou dovnitř formace jen v malém množství, ačkoli se mohou snadno adsorbovat na povrch biofilmu. Mikro-

organismy se nemnoží vůbec nebo velice pomalu, proto jsou více rezistentní vůči působení antibiotik a chemoterapeutik, která působí pouze na množící se buňky buď mikrobistaticky nebo mikrobicidně (Klaban 2011). Volně se vyskytující, tzv. planktonické mikroorganismy, se na rozdíl od přisedlých mohou pohybovat, rychleji rostou, vyznačují se vyšší virulencí a zároveň vyšší vnímavostí k léčbě antibiotiky. Tato forma života vyžaduje více dostupných živin než biofilm (Pirrone, Pincioli et al. 2016).

Fyziologický biofilm, například vaginální mikroflóra, je žádoucí a výhodný i pro hostitele, který je tak chráněn před přisednutím patogenních mikroorganismů. Biofilmy se uplatňují také v biotechnologických postupech. Často je však biofilm pro člověka nevídanou příčinou zdravotních problémů (Klaban 2011).

Obrázek 4-1 Biofilm



Zdroj: Hoiby 2014 (přepřacováno z textu do obrázku)

V rámci tvorby diplomové práce jsem dostala příležitost spolupracovat s panem doc. MUDr. Pavlem Čermákem, CSc., primářem Oddělení klinické mikrobiologie Thomayerovy nemocnice v Praze, na výzkumu četnosti výskytu producentů biofilmu na centrálních žilních katétrech. Některé kmeny bakterií jsou tvorbou biofilmů obzvláště významné a mohly by být příčinou závažných infekčních komplikací léčby. V současné době známe pouze málo látek, které dokáží ovlivnit tvorbu biofilmu a právě proto hledáme nové způsoby, jak léčit nemoci, u kterých byla prokázána přítomnost biofilmu. Nové látky se hledají i mezi přírodními sloučeninami. V experimentální části diplomové práce jsme zkoušeli vliv antibakteriálně účinného xanthohumolu na biofilm.

5 ZADÁNÍ A CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo shrnout dostupné informace o biofilmech, jejich vzniku, vlastnostech a o významu biofilmu pro člověka. Biofilmy mohou mít funkci fyziologickou, mohou však také působit závažná onemocnění nereagující na běžnou léčbu. Ve druhé části práce jsme znázornili četnost výskytu biofilmu na katétrech. Posledním úkolem práce bylo stanovit, jak odolný je biofilm tvořený běžnými původci biofilmu, jako je *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*, vůči přírodním látkám, konkrétně xantohumolu.

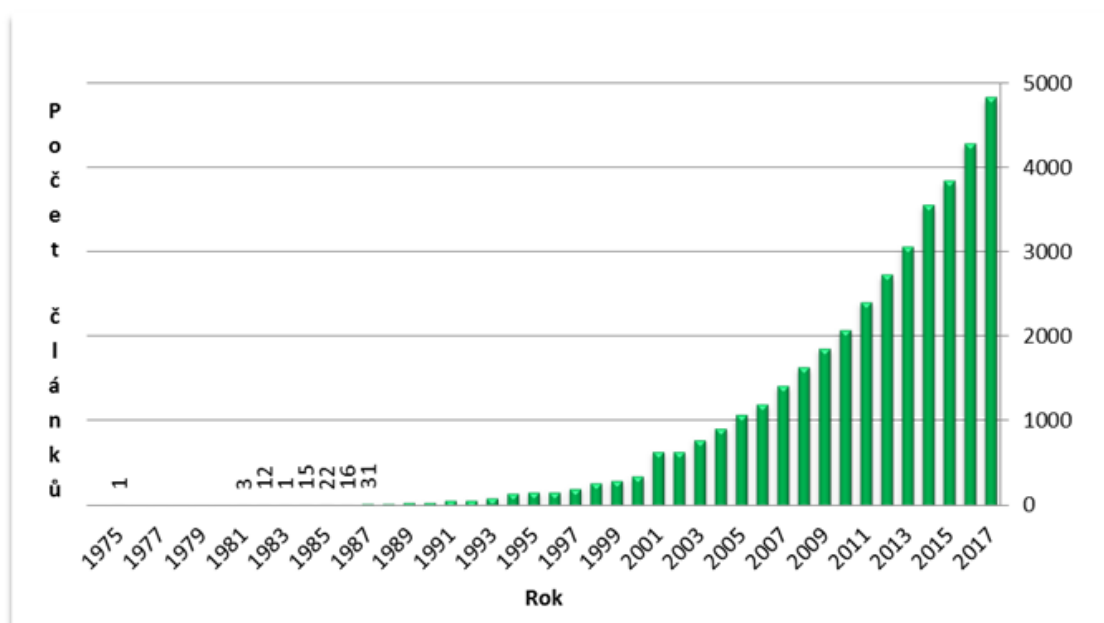
6 TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Obecná charakteristika biofilmu

6.1.1 Historické aspekty

První zmínka o biofilmu v databázi PubMed pochází z roku 1975 od autora Macka a kolektivu. Příspěvek pojednává o tvorbě biofilmu na filtrech při čištění odpadních vod (Mack, Mack et al. 1975). Od té doby zájem o biofilmy prudce stoupá.

Graf 6-1 Počet článků na téma biofilm v databázi PubMed v letech 1975-2016



Zdroj dat: PubMed

Mikroorganismy žijící ve shlucích, obklopené osobně vyprodukovanou hmotou, přisedlé na plochách, tkáních nebo sekretech jsou pozorovány již od vzniku samotné mikrobiologie. Tento jev popisoval už Leeuwenhoek a Pasteur. První mikroskopická pozorování zveřejnil okolo roku 1700 Anthony van Leeuwenhoek. Záznamy pochází z let 1683 až 1708. Tento holandský vědec pozoroval vzorky ze své vlastní dutiny ústní, z povrchu zubů a jazyka. Francouzský vědec Louis Pasteur pozoroval a skicoval agregace bakterií ve víně, přičemž objevil princip pasterizace. Zájem mikrobiologického výzkumu byl neustále soustředěn také na volně žijící, tzv. planktonické bakterie a jejich chování a patogenitu (Hoiby 2014).

Pojem film se začal používat v souvislosti s bakteriemi v mořské mikrobiologii. Angst roku 1922 formuloval názor, že sliz na dně lodí je důsledkem zanášení (znečištění) mikroorganismy, tzv. biofouling (Zobell a Allen 1935). Henrici pojmem film nazval přisedlé mikroorganismy a odlišil je tak od volně žijících. Studoval přímou mikroskopii biofouling ve vodě a přišel na to, že většina bakterií ve vodě žije právě přisedle (Henrici 1933). ZoBell a Allen poté studovali vývoj biofoulingu. Jako první začali používat termín biofilm a to v oblasti přírodního prostředí a techniky (Zobell a Allen 1935).

Hoiby poprvé pozoroval shluky bakterií *Pseudomonas aeruginosa* ve sputu a plicní tkáni pacientů s cystickou fibrózou za využití běžné mikroskopie s barvením podle Grama v letech 1970 až 1972. Později popsal také sliz okolo mikroorganismů a vyslovil domněnku, že by je mohl chránit před imunitním systémem hostitele. Zubní lékaři mezi prvními potvrdili problém se společenstvími mikroorganismů v souvislosti s tvorbou zubních kazů a periodontitidy (Jendresen a Glantz 1981, Hoiby 2014).

Jendresen a Glantz použili jako první termín biofilm v medicíně a biofilm v medicínské mikrobiologii představil Costerton v roce 1985. Costerton importoval pojem do této oblasti a prosadil ho tu díky své iniciativnosti a mnohým pozorováním. Dal pojem biofilm do spojitosti se zvyšující se rezistencí oproti volně žijícím bakteriím. Do té doby se v oblasti medicíny nazývaly biofilmy jako bakterie žijící přisedlým životem a termín biofilm zůstával pouze v oblasti techniky a životního prostředí (Jendresen a Glantz 1981, Costerton, Cheng et al. 1987).

Přenos infekcí prostřednictvím biofilmu a obecně biofilm ve zdravotnictví je objektem zájmu méně než 40 let. Od té doby nemoci způsobené biofilmem nabýly na důležitosti a všeobecném povědomí (Hoiby 2014).

6.1.2 Metody výzkumu biofilmu

6.1.2.1 Vývoj experimentálních metod

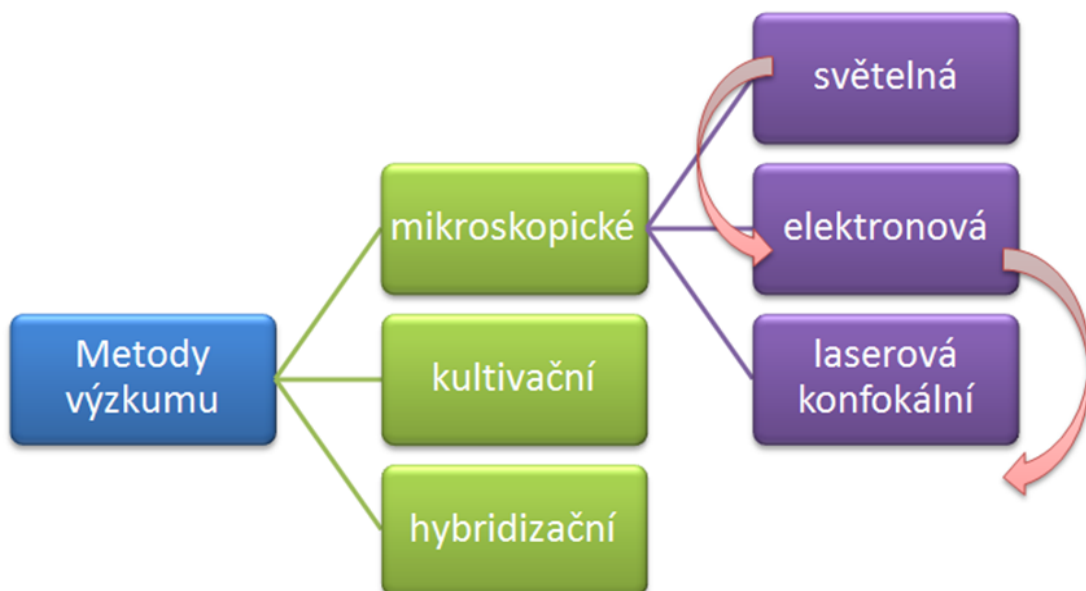
Před rokem 1980 badatelé studovali biofilm pouze za pomoci světelné a elektronové mikroskopie na pevném povrchu (Hoiby 2014). Po roce 1990 byl již k dispozici konfokální laserový skenovací mikroskop, který umožnil pozorování žlutě, zeleně nebo modře fluorescenčně barvených proteinů v jednodruhovém či více druhovém biofilmu za různých podmínek. Mikroskop umožňuje analyzovat silné biofilmy s velkým počtem

buněk a sestavit trojrozměrný obraz biofilmu. Pozorovány byly buňky uvnitř biofilmu, avšak strukturu biofilmu ze 73-98 % tvoří extracelulární materiál a prázdné prostory. Tato pozorování rozšířila obzory a chápání základních vlastností biofilmu a života mikroorganismů (Lawrence, Korber et al. 1991).

Kultivace biofilmů v jamkách mikrotitračních destiček spolu s barvením krystalovou violetí umožnilo sledovat schopnost bakterie tvořit biofilm, interakci biofilmu s antibiotiky (ATB) nebo růst bakterie v biofilmu. Ceri s kolektivem navrhli metodu zkoušení biofilmu v 96 jamkách najednou, přičemž se biofilmy téměř neliší a následně hodnotí skenovací elektronovou mikroskopií (Ceri, Olson et al. 1999). Metodu s barvením krystalovou violetí jsem si mohla sama vyzkoušet a sledovat vlastnosti biofilmů různých mikroorganismů, jak uvádím dále v experimentální části.

Dalším způsobem zachycení tvorby biofilmu je na kuponech z nerezové oceli. Testují se různé metody a plochy a jejich sklon k tvorbě biofilmu. Například *Listeria monocytogenes*, která je častým původcem biofilmu a kontaminace v potravinářství, byla testována v prostředí kuponů z oceli a na mikrotitračních destičkách. Růst biofilmu mikroorganismů se v různých podmínkách lišil (Djordjevic, Wiedmann et al. 2002).

Graf 6-2 Metody výzkumu biofilmu s naznačením vývoje



Zdroj: Hoiby 2014, Lawrence, Korber et al. 1991, Ceri, Olson et al. 1999 (přepřacováno z textu do grafu)

6.1.2.2 Diagnostika biofilmu v humánní medicíně

Biofilmy v klinických vzorcích, jako je sputum nebo tkáň získaná biopsií, mohou být pozorovány světelným mikroskopem. Přesná identifikace všech složek biofilmu je možná pomocí DNA hybridizace. K rozeznání jednotlivých složek matrixu biofilmu badatelé používají také speciální barvicí techniky (Bjarnsholt, Jensen et al. 2009). Bakterie jsou před testováním uvolňovány z biofilmu za pomoci ultrazvuku. Doba působení ultrazvuku po jednu minutu rozvolní biofilm, delší působení by způsobilo usmrcení bakterií. Tak je umožněna detekce jednotlivých mikroorganismů a jejich DNA (deoxyribonukleová kyselina) (Kobayashi, Bauer et al. 2007).

Příkladem diagnostické metody může být studie Olejníčkové s kolektivem, která se zabývá testováním tvorby submerzního biofilmu katérových izolátů *Pseudomonas aeruginosa* pomocí Christensenovy metody. Do jamek mikrotitrační destičky pipetovali mozkosrdcovou infuzi (BHI-Brain heart infusion), glukózu a bakteriální suspenzi. Po dvaceti čtyř hodinové kultivaci jamky propláchli a fixovali biofilm sušením. Poté adherovaný biofilm v jamkách destičky barvili krystalovou violetí, barvivo rozpustili v ethanolu a spektrofotometricky kvantifikovali nárůst. Aerovaný biofilm určili za podobných podmínek, pouze mikrotitrační destička byla nahrazena polystyrenovými zkumavkami. Po kultivaci hodnotili přítomnost a charakter blanky na povrchu média, která byla následně pohybem zkumavky přichycena ke stěně, promyta, fixována sušením a barvena. *Pseudomonas aeruginosa* jako aerobní mikroorganismus častěji tvořil aerovaný biofilm. Prostředí močových infekcí je však více podobné prostředí pro tvorbu submerzního biofilmu a dává tak bližší představu o infekcích na močových katétrech. Submerzní biofilm tvořilo 80 % izolátů a aerovaný biofilm 90 % izolátů *Pseudomonas aeruginosa*. Většina kmenů, jež netvořila biofilm submerzní, byla schopna tvořit biofilm aerovaný (Olejníčková a Holá 2012).

Běžné kultivační techniky ukazují vlastnosti planktonických bakterií, určit vlastnosti biofilmů však může být značně složitější (Hoiby, Bjarnsholt et al. 2010). Ze studií např. vyplývá, že minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) ATB potřebná k potlačení bakterií rostoucích v biofilmu může být 100 až 1000 násobně vyšší než na bakterie volně žijící (Anwar a Costerton 1990).

6.2 Stavba biofilmu

6.2.1 Stádia tvorby biofilmu

Na počátku formování biofilmu se na pevný povrch adsorbují organické molekuly tvořící během desítek minut molekulární film. Poté se na tento film přichytávají bakterie, které v průběhu 24 hodin vytvářejí tzv. bakteriální osídlení. První fáze je vratná, neboť bakterie udržují slabé Van der Waalsovy síly, elektrostatické interakce, slabé molekulové vazby nebo přívěsky těl bakterií, např. bičíky a fimbrie (pili). Soudržnost je ovlivněna různými faktory, jako je pohyb bakterií, tlak a teplota prostředí, koncentrace planktonických organismů nebo vlastnostmi povrchu, na který bakterie přisedají (Garrett, Bhakoo et al. 2008, Klaban 2011, Gupta, Sarkar et al. 2016, Pirrone, Pinciroli et al. 2016).

Významnou roli při adhezenci mikroorganismů hrají také hydrofobní interakce mezi nepolárním hydrofóbním povrchem a bakteriemi. Toto působení napomáhá překonat odpudivé síly a usnadňuje přisedání. Působení bylo sledováno v souvislosti se schopností mikroorganismů degradovat nepolární polymery (Tribedi a Sil 2014).

Druhým krokem tvorby biofilmu je aktivace signálních molekul a tvorba buněčných interakcí jako následek zesílení vazeb a nevratného přisedání dalších bakterií. Po iniciační fázi může následovat adherence vyšších organismů trvající obvykle několik dnů (Garrett, Bhakoo et al. 2008, Klaban 2011, Pirrone, Pinciroli et al. 2016).

Pro třetí a čtvrtou fázi je typické tzv. zrání (maturace), které se projevuje nahromaděním buněk, formováním mikrokolonií, růstem mikrokolonií, komunikací mikroorganismů a následně expresí specifických genů. Uvolnění exopolysacharidů umožní rychlý a významný růst biofilmu. Jakmile biofilm dosáhne dostatečného počtu mikroorganismů, začne pracovat řídicí jednotka quorum sensing (QS) (Davies, Parsek et al. 1998, Klaban 2011, Gupta, Sarkar et al. 2016, Pirrone, Pinciroli et al. 2016).

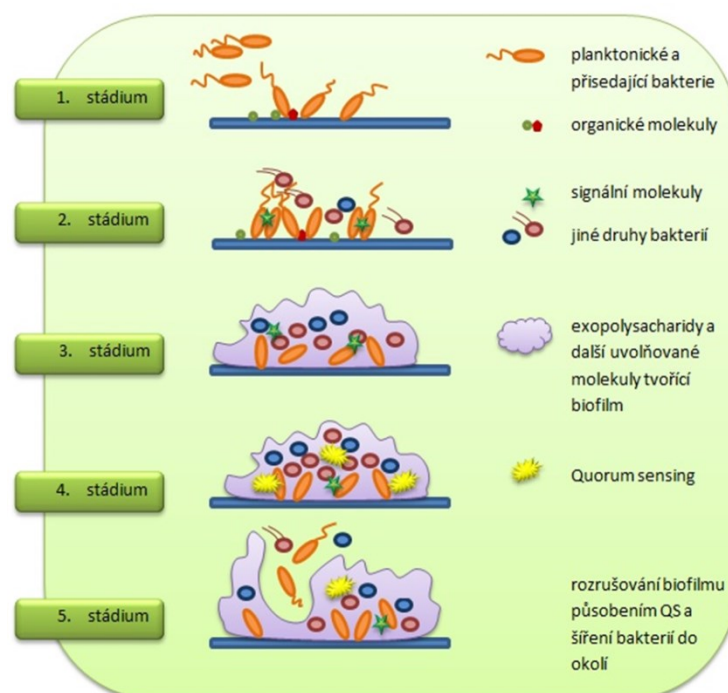
QS reguluje uvolňování enzymů a toxinů z biofilmu. Specifické enzymy v této fázi rozrušují extracelulární matrix, tím umožní uvolnění bakterií do okolí a kolonizaci nových míst. Mnozí autoři toto stádium počítají jako páté (Pirrone, Pinciroli et al. 2016). Jednotlivé druhy bakterií uvolňují konkrétní specifické enzymy. *Pseudomonas aeruginosa* a *Pseudomonas fluorescens* např. uvolňují enzym alginát lyázu, *Escherichia*

coli N-acetyl-heparosan lyázu a *Streptococcus equi* produkuje enzym hyaluronidázu k rozrušení matrixu biofilmu. Přítomnost odlišných druhů bakterií v biofilmu prostřednictvím kooperace, komensalismu, kompetice, genetického přenosu a komunikace zajišťuje adaptabilitu k prostředí (Hoiby, Bjarnsholt et al. 2010, Gupta, Sarkar et al. 2016).

Jiní autoři dělí vývoj biofilmu na tři období. První fází je reverzibilní (vratná) adheze, následuje ireverzibilní (nevratná) adheze a poté tvorbu biofilmu. Každá fáze zahrnuje genovou expresi jednoho nebo více produktů (Dunne 2002). První stádium tvorby biofilmu je podle této skupiny autorů nazýváno jako docking. Bakterie přisedají na povrch, ale fáze je vratná. Tato etapa je přirovnávána k lodi a přístavišti. Loď už sice je v přístavu, ale stále ji vítr může zanést zpět na moře (Dunne 2002, Klaban 2011).

Ve druhém stádiu loď spouští kotvu a je v přístavu nevratně zakotvena. Mikroorganismy ireverzibilně adherují k povrchu díky produkované matrix a fimbriím či jiným vazbám. Mikroorganismy poté začnou produkovat adheziny, jež zaručí přisedání dalších druhů mikroorganismů. Zrání biofilmu je pak závislé na přísunu živin, pH prostředí, přítomnosti kyslíku, uhlíku a osmolaritě. Když biofilm dosáhne určitého rozměru, začne uvolňovat planktonické bakterie, které kolonizují jiná místa a povrchy (Dunne 2002).

Obrázek 6-1 Stádia tvorby biofilmu



Zdroj: Gupta, Sarkar et al. 2016 (přepřacováno z textu do obrázku)

6.2.2 Jednotlivé složky biofilmu

6.2.2.1 Seskupení mikroorganismů a matrix

Zastoupení jednotlivých mikroorganismů uvnitř biofilmu je ovlivněno množstvím proteinů, kovů, živin a různými antimikrobními látkami v prostředí (Wakeman, Moore et al. 2016). Biofilmy mohou být jednoduché (jednovrstevné) nebo vícevrstevné. Bakterie tvoří častěji vícevrstevná shromáždění, interakce však byly studovány na jednovrstevných strukturách, kde jsou síly více viditelné. Vnější vrstva biofilmu se chová jako difúzní bariéra pro kyslík a propouští pouze omezené množství. V hlubších vrstvách biofilmu není kyslík přítomen a vyskytují se zde anaerobní mikroorganismy. Jednotlivé vrstvy se mohou lišit také elektrickým nábojem, což zřejmě usnadňuje transport látek v biofilmu (Karatan a Watnick 2009, Klaban 2018).

Podoba biofilmu se liší podle druhu mikroorganismu. Liší se tloušťka vrstev a uspořádání organismů. Biofilm rodu *Pseudomonas* např. má těsněji spojené buňky na povrchu biofilmu a dostává tvar pyramidy. Přesně naopak je staven biofilm bakterie *Vibrio parahaemolyticus*, jejíž tvar je označován jako tvar houby. Analýza pomocí fluorescenční hybridizace in situ ukázala, že kolonie *Pseudomonas aeruginosa* ve smíšeném biofilmu se nachází na spodu biofilmu, zatímco *Staphylococcus aureus* obývá povrch biofilmu (Lawrence, Korber et al. 1991, Dunne 2002).

Pohyblivé bakterie využívají fimbrie (pili) na svém povrchu k osídlení svrchní části biofilmu. Přes ostatní kolonie se transportují až na vrchol a vytvoří něco jako čepičku biofilmu. Biofilm je jinak strukturovaný, nutné pro samotnou tvorbu biofilmu však fimbrie nejsou (Klausen, Heydorn et al. 2003).

Biofilm umožňuje mikroorganismům různé druhy soužití. Příkladem může být syntrofismus, což je druh symbiózy, kde dvě bakterie navzájem využívají zplodiny metabolismu jako zdroj energie. Mikroorganismy uvnitř biofilmu mají oproti volně žijícím odlišný metabolismus a vyvinutou metabolickou rozličnost i reprodukční způsobilost (Schink 1997, Tribedi, Gupta et al. 2015, Gupta, Sarkar et al. 2016).

Extracelulární matrix je složena převážně z exopolysacharidů, které jsou výrazně hydrofilní a dodávají bakteriím dostatek vody a živin pro růst. Má specifickou strukturu s kanálky, které zajistí přísun kyslíku, vody a živin hlubším vrstvám bakterií v biofilmu.

Molekulami polysacharidů jsou prokládány molekuly proteinů a řetězců DNA. Dá se říci, že biofilm je vlastně hydrogel s viskózními a elastickými vlastnostmi. Díky tomu odolává mechanickému působení (Gupta, Sarkar et al. 2016, Pirrone, Pincioli et al. 2016).

Uvolňované exopolysacharidy stabilizují biofilm. Nezralý biofilm *Pseudomonas aeruginosa* je proto citlivý k působení deoxyribonukleáz (DNáz), kdežto zralý biofilm obsahující více polysacharidů je mnohem více odolný (Whitchurch, Tolker-Nielsen et al. 2002). *Pseudomonas aeruginosa* uvolňuje tři typy polysacharidu: alginát, Pel a pentasacharid Psl. Alginát reakcí s dostupnými živinami a vodou zprostředkovává zásobování biofilmu. Pel je polysacharid bohatý na glukózu formující povrch biofilmu. Tyto dva produkty bakterie *P. aeruginosa* vytváří základ struktury jejího biofilmu (Gupta, Sarkar et al. 2016).

Biofilm gramnegativních bakterií má většinou negativní náboj daný přítomností tzv. O-antigenů (somatický antigen). Ten je však ve vícevrstevném biofilmu často neutralizován působením dalších sil. Může být ovlivněn také mutací genu pro daný antigen, snížením syntézy, syntézou exopolymerních sloučenin a další (Feldman, Wacker et al. 2005).

Biofilm bakterie *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis* obsahuje specifický polysacharidový antigen nazývaný polysacharidový mezibuněčný antigen (PIA-polysaccharide intercellular antigen). Tento antigen zprostředkovává mezibuněčnou adhezi a je nezbytný pro vytváření a kumulaci biofilmu. Skládá se ze dvou polysacharidů, jeden je v nadbytku, částečně acetylovaný a částečně pozitivně nabitý. Druhý polysacharid je spíše anionický (Mack, Fischer et al. 1996). K jeho syntéze slouží tzv. ica lokus, jenž je celkově nezbytný pro tvorbu biofilmu (Cramton, Gerke et al. 1999).

Vyvinutý biofilm dosahuje tloušťky okolo 100 μm a obsahuje různé druhy kolonií mikroorganismů. Tím je umožněna výměna substrátů, rozdělování produktů látkové výměny bakterií a odstraňování toxických zplodin metabolismu (Gupta, Sarkar et al. 2016).

6.2.2.2 Signální systémy

Buňky uvnitř biofilmu si předávají informace pomocí chemických signálů. Probíhá mezi nimi rychlejší přenos genů a informací než mezi buňkami volnými (Klaban 2011). V biofilmu fungují také signální sítě, které převádí informace z mikroregionu životního prostředí do snímacího systému, a ten poté vygeneruje odpověď. Snímací systém biofilmu zahrnuje dvousložkovou soustavu, extracytoplasmatické signální dráhy a QS. Dvousložková soustava se skládá z histidin-kinázy ve funkci senzoru a z odezvu regulujícího proteinu (RR-response regulator protein). Systémy biofilmu pak v reakci na podnět (živiny, tlak, teplota a další) vytváří odpověď v podobě malých molekul, např. cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), který stimuluje růst (Jonas, Melefors et al. 2009, Bordi a de Bentzmann 2011).

Quorum sensing je způsob komunikace mezi bakteriemi využívající autoinduktory nebo feromony. Bakterie musí mít také receptory pro přijetí signálu od jiné bakterie. Pro gramnegativní bakterie je molekulami QS často lakton N-acetylhomoserin, pro grampozitivní jsou to oligopeptidy a pro kvasinky farnesol a tyrosol. QS aktivuje geny, které následně spustí produkci enzymů a toxinů. Dále QS usměrňuje pohyblivost, růst biofilmu, jeho toleranci k ATB, imunitní odpověď a faktory virulence. Vztah mezi biofilmem a QS autoři nazvali sociomikrobiologie (Schauder a Bassler 2001, Hoiby, Bjarnsholt et al. 2010, Bordi a de Bentzmann 2011).

6.3 Ochrana mikroorganismů uvnitř biofilmu

6.3.1 Odolnost biofilmu vůči imunitnímu systému hostitele

6.3.1.1 Biofilm a imunitní systém

Mikroorganismy jsou schopny vytvořit biofilm na tkáních hostitele pouze za určitých podmínek. Budování biofilmu závisí na stavu imunitního systému hostitele. Pokud je imunitní systém oslaben či narušen, bakterie se mohou shlukovat a snadněji přichytit. Tvorbě patologického biofilmu brání také již vytvořený fyziologický biofilm, který při narušení jako ochrana selže. Dlouho zvýšené a aktivované obranné mechanismy hostitele na druhou stranu mohou poškodit tkáň hostitele a okolí stimulu. To se poté projeví jako zhoršená kvalita života pacienta s chronickou infekcí (Beikler a Flemmig 2011).

Biofilm může také stimulovat vznik autoimunitních chorob. Gallo a kolektiv v roce 2015 popsali vztah složek uvnitř bakteriálního biofilmu. Amyloidní protein curli produkovaný bakteriemi zde tvoří vlákna spolu s bakteriální DNA, následně je urychlena polymerizace a vytváří se komplexy curli-DNA, které poté aktivují imunitní systém, zahrnující také dendritické buňky. Dendritické buňky začnou produkovat cytokiny, konkrétně interferony typu I, jež jsou patogenní v systémovém lupus erythematosus (Gallo, Rapsinski et al. 2015).

Problémem je také schopnost mikroorganismů z biofilmu napadat další tkáň a působit tak další onemocnění. Biofilmy dutiny ústní tak mohou být úschovnou mikroorganismů, jež následně mohou vyvolat onemocnění plic. Identifikovány na zubech byly např. patogeny *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* B, *Streptococcus pyogenes* a *Moraxella catarrhalis*. Správná ústní hygiena by mohla snížit výskyt respiračních infekcí u starších lidí (O'Donnell, Smith et al. 2016).

6.3.1.2 Obrana hostitele proti biofilmu

Někteří lidé mají obzvlášť vysoké riziko infekce a vytvoření patogenního biofilmu, a to pacienti zatížení jinou chorobou, jako je diabetes mellitus a cystická fibróza (Mottola, Mendes et al. 2016). Jejich tělo má pouze malou schopnost bránit stavbě biofilmu (Ciofu, Tolker-Nielsen et al. 2015).

Hostitel reaguje na přítomnost bakteriální infekce spuštěním několika kaskád imunitního systému, cytokiny a expresí genů. Kromě rezistence na ATB se může u biofilmu projevit rezistence vůči bakteriofágům, chemickým biocidním látkám a dalším a celkově na imunitní odpověď hostitele. Proces obrany hostitele tedy není u infekcí spojených s biofilmy úspěšný jako u onemocnění způsobených planktonickými bakteriemi (Wolcott, Rumbaugh et al. 2010, Hartmann a Schikora 2012).

Zastoupení jednotlivých mikroorganismů uvnitř biofilmu je ovlivněno množstvím proteinů, kovů, živin a dalšími látkami v prostředí, jak bylo již uvedeno výše. Nutriční imunita je proto důležitým obranným mechanismem hostitele. Mezi její principy patří vazba železa pomocí proteinů transferinu nebo laktoferinu, dále chelatace zinku a hořčíku působením kalprotektinu. Deplece železa pak může například způsobit zvýšenou produkci alkylových hydroxychinolonů u bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

Tyto látky pak lyzují buňky stafylokoků pro vlastní využití jako nový zdroj železa (Wakeman, Moore et al. 2016).

Kalprotektin je vrozený protein imunitního systému. Jeho antimikrobní aktivita spočívá ve schopnosti vázat přechodné kovy daleko od patogenů. Často je však distribuován neúplně kvůli ochranným mechanismům biofilmu. Kalprotektin zajišťuje také soužití *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* tím, že potlačuje tvorbu antistafylokokových látek bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. Kalprotektin je přítomen ve vzdušných prostorech biofilmu, kde pak mohou koexistovat různé další mikroorganismy (Wakeman, Moore et al. 2016).

6.3.2 Odolnost vůči antibiotické léčbě

Biofilmy, jako forma soužití mikroorganismů, vykazují mnohočetnou lékovou rezistenci a je všeobecným zájmem ji snížit. Mikroorganismy žijící v biofilmu se často stávají původci chronických závažných a životu nebezpečných infekčních onemocnění. Selhání konvenční terapie a snížená účinnost ATB je spojována s biofilmy a biofilm-tvořícími bakteriemi a kvasinkami. Tento stav vyžaduje často delší léčbu a vysoké dávky léčivých látek. Přesto není terapie vždy účinná. Volně žijící bakterie a bakterie v první fázi tvorby biofilmu, kdy bakterie přisedají k povrchu, jsou citlivější na ATB. Pokud volně žijící bakterie rezistentní k ATB vytvoří biofilm, rezistence se ještě zvýší (Hoiby, Bjarnsholt et al. 2010, Bjarnsholt, Ciofu et al. 2013, Ribeiro, Felicio et al. 2016).

Antimikrobní látky zřídka kdy dosáhnou efektivní koncentrace uvnitř extracelulární matrix biofilmu. K hlubším vrstvám v biofilmu se látky dostanou jen v malé koncentraci. Biofilm také poskytuje mikroorganismům dostatek času k úpravě genetické exprese. Různé druhy organismů pak zajistí výměnu genů a synergicky zesílí svou kapacitu pro přežití proti působení ATB (Pirrone, Pincioli et al. 2016). Všechny patogenní, komenzální bakterie i bakterie životního prostředí, genetické elementy a bakteriofágy tvoří rezervoár pro geny tvořící rezistenci na ATB (ARGs, tzv. resistom), ze kterého pak mohou patogenní bakterie získat rezistenci přes horizontální přenos genů. Díky tomu se infekce šíří z druhů bakterií žijících v přírodě na druhy patogenní. Větší význam, než vědci dříve předpokládali, může mít také transformace a transdukce bakterií (von Wintersdorff, Penders et al. 2016).

Obecně existují tři hypotézy o vzniku rezistence biofilmu k ATB. První předpokládá, že ATB není schopno proniknout do biofilmu. Při snaze prostoupit biofilmem a matrixem může být účinek léku snížen. Aminoglykosidová antibiotika se přichytí na vnější polymerní povrch biofilmu, který může snížit penetraci ATB. Exopolysacharidy (alginát, gellan) v roli bariéry studoval Kumon a kolektiv na biofilmu bakterie rodu *Pseudomonas*. Pozitivně nabité molekuly hydrofilních ATB jako jsou aminoglykosidy nebo polypeptidy se napojí na negativně nabitou matrix biofilmu. Tato interakce brání průchodu ATB do hloubky biofilmu. U jiných ATB jako jsou betalaktamy, makrolidy nebo chinolony nebyla zaznamenána snížená aktivita. Reakci navíc ovlivňuje přítomnost vápenatých kationtů a dalších molekul (Kumon, Tomochika et al. 1994, Stewart a Costerton 2001).

Druhý předpoklad říká, že prostředí biofilmu se mění, neboť v hlubších vrstvách není dostupný kyslík pro potřebu mikroorganismů. Některé třídy ATB, jako jsou aminoglykosidy, ztrácí v anaerobním prostředí svůj účinek. V biofilmu se hromadí kyselé odpadní látky, což má za následek změnu pH a ztrátu účinku dalších ATB. Účinek může být snížen také, pokud je část biofilmu metabolicky inaktivní. Osmotický stres zajistí snížení počtu pórů v membránách buněk a tím omezí transport léku (de Beer, Stoodley et al. 1994, Stewart a Costerton 2001). Třetí názor předpokládá, že skupina bakterií žijící v biofilmu by upravila svůj fenotyp na ochranný a tím nastolila rezistenci (Gupta, Sarkar et al. 2016).

Boles a Singh ukázali, že oxidační stres uvnitř biofilmu vyvolává snížení účinku ATB a přidáním antioxidantů lze snížit druhovou rozmanitost kolonií. Oxidační stres biofilmu vzniká následkem nepoměru mezi zvýšenou produkcí endogenních reaktivních forem kyslíku a nedostatkem antioxidačních systémů. Oxidační stres je pak příčinou mutací (Boles a Singh 2008).

6.4 Patogenní biofilm

6.4.1 Patogenní mikroorganismy tvořící biofilmy

Staphylococcus je rod zahrnující většinou fakultativně anaerobní, některé aerobní grampozitivní koky, které se vyskytují často ve shlucích, někdy jednotlivě, po dvojicích nebo v krátkých řetězcích. Jsou nepohyblivé, tvoří spory, tvoří biofilm

a vykazují pozitivní katalázový test. *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, někdy označovaný jako *Staphylococcus pyogenes* nebo zlatý stafylokok, je striktní patogen vyvolávající různé hnisavé procesy v organismu člověka i zvířat. Mezi lokalizovaná onemocnění patří např. folikulitidy, karbunkly, furunkly, impetigo, blefaritidy (zánět očního víčka) a infekce ran, záněty mandlí (tonzilitidy), záněty středního ucha (otitidy), záněty nosních a čelistních dutin (sinusitidy) a záněty mléčné žlázy (mastitidy) (Klaban 2018).

Podle současných znalostí se na patogenitě této bakterie podílí substance vázané na buňku, jako jsou adheziny, peptidoglykan, protein A, slizová vrstva, vázaná plasmakoaguláza, specifické antigeny a extracelulární faktory produkované do okolního prostředí. K extracelulárním faktorům patří DNáza, různé hemolyziny, hyaluronidáza, leukocidiny, volná plasmakoaguláza a lipázy. DNáza hydrolyzuje 5-fosfodiesterové vazby uvnitř deoxyribonukleové kyseliny, což umožňuje pronikání bakterií dále do tkáně. Hnis, hromadící se v oblasti stafylokokové infekce, často obsahuje viskózní DNA uvolněnou z mrtvých fagocytů a ostatních buněk. DNáza touto hydrolýzou zkapalňuje hustou tekutinu s obsahem hnisu (Klaban 2018).

MRSA (z angl. methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) jsou kmeny *Staphylococcus aureus*, které projevují rezistenci na řadu polosyntetických preparátů penicilinu a na mnohá další ATB. Z tohoto důvodu jsou obávanými a nebezpečnými bakteriemi u pacientů v nemocnicích a jejich léčba může být dlouhá a komplikovaná (Nostro, Guerrini et al. 2016, Klaban 2018).

Staphylococcus epidermidis se běžně nachází na kůži a sliznicích člověka. Je součástí přirozené mikroflóry povrchu lidského těla. Jako příležitostný patogen vyvolává infekční endokarditidu a jiné nozokomiální infekce (Klaban 2018).

Streptococcus je rod grampozitivních bakterií okrouhlého až ovoidního tvaru, které žijí ve dvojicích nebo tvoří různě dlouhé řetízky. Jsou fakultativně anaerobní, nepohyblivé a netvoří spory. Podle schopnosti hemolyzovat okolí se dělí na viridující streptokoky s částečnou hemolýzou (hemolýza α , typická mikroflóra dutiny ústní), úplné (hemolýza β) a tzv. γ -hemolytické, tedy bez hemolýzy. Patogenní streptokoky produkují látky s enzymatickou aktivitou, jako je deoxyribonukleáza, dříve také zvaná streptodornáza, štěpící DNA, dále streptokináza (fibrinolysin), proteáza a lipáza. Tyto látky umožňují šíření infekce ve tkáních (Klaban 2018).

Streptococcus pneumoniae se vyskytuje ve dvojicích a jeho buňky jsou na straně obrácené k druhému členu dvojice charakteristicky zploštělé. V průběhu infekčního procesu uplatňuje adheziny, zejména povrchový antigen A, invaziny, konkrétně hyaluronidáza a dvě neuraminidázy, protein A vázající cholin a autolysin. Biofilmy této bakterie byly pozorovány u chronických infekcí. Mezi onemocnění vyvolaná *Str. pneumoniae* patří bronchitidy a záněty plic (pneumonie). Jsou však i běžným nálezem na sliznicích horních cest dýchacích u zdravé populace. Jako prevence pneumokokových infekcí se podává vakcína vyrobená z polysacharidů pouzdra bakterie *Streptococcus pneumoniae* (Klaban 2018).

Streptococcus pyogenes reprezentuje nejdůležitější mikroorganismus z beta-streptokoků. Je příčinou onemocnění respiračního traktu, např. tonsilitid, faryngitid, pneumonií, dále působí hnisavé infekce kůže, sinusitidy, otitidy, mastitidy, infekce kostní a kožní, a to jak povrchové infekce, např. impetigo, tak i hluboké, jakou je celulitida. Postinfekčními (poststreptokokové) následky mohou být revmatická horečka nebo akutní glomerulonefritida (Klaban 2018).

Zástupci rodu *Enterococcus* obývají střevní systém člověka a zvířat. Mohou být grampozitivní a kataláza negativní. Enterokoky nikdy netvoří spory, jsou odolné vůči vysokému pH, hypertonickému prostředí, vysokým i nízkým teplotám. Významnými zástupci jsou *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* a *E. avium*. Enterokoky působí infekce močových a žlučových cest, prokázány však byly i při endokarditidě a jiných infekcích v oblasti dutiny břišní (Klaban 2018).

Listeria monocytogenes je grampozitivní, fakultativně anaerobní bakterie, která netvoří spory. Je schopna tvořit biofilm. Působí infekce listeriózy, které nejsou příliš časté, ale zato závažné (Schlech, Lavigne et al. 1983, Colagiorgi, Di Ciccio et al. 2016).

Escherichia je rod zahrnující různé bakterie, z nichž nejdůležitější je *Escherichia coli*. *E. coli* z čeledi *Enterobacteriaceae* je tyčinkovitá gramnegativní bakterie tvořící biofilm. Fyziologicky se bakterie vyskytuje v gastrointestinálním traktu člověka a teplokrevných živočichů, kde produkuje důležité vitaminy a brání růstu škodlivých bakterií. Při přemnožení bakterie působí onemocnění močových cest a průjemová onemocnění, především u malých dětí. Zvýšený výskyt *E. coli* ve vodě či potravinách poukazuje na tzv. fekální kontaminaci (Nostro, Guerrini et al. 2016, Klaban 2018).

Klebsiella pneumoniae z rodu *Enterobacteriaceae* je gramnegativní bakterie ve tvaru tyčinky s nápadným pouzdrem. Fermentuje laktózu. *Klebsiella* je přítomna v ústech, ve střevech a na pokožce. Může způsobit vážné potíže především u pacientů s oslabenou imunitou, a to nemoci respiračního ústrojí, močových cest a další přestupem z krevního řečiště. Biofilm této bakterie byl pozorován na katétrech a implantátech a je jednou z příčin chronicity onemocnění, které působí (Podschn a Ullmann 1998, Jagnow a Clegg 2003, Schroll, Barken et al. 2010).

Pseudomonas aeruginosa je zástupcem v přírodě široce rozšířeného rodu *Pseudomonas*, s kterým se můžeme setkat na rostlinách, ve vodě, v půdě či v lidských a zvířecích exkrementech. Tyto gramnegativní rovné nebo zahnuté tyčinky patří k tzv. nefermentujícím tyčinkám, netvoří spory, produkují katalázu a oxidázu a mají širokou genetickou variabilitu. Jsou původcem onemocnění rostlin, způsobují kažení potravin především živočišného původu. *Pseudomonas aeruginosa* patří mezi fluorescenční druhy produkující fluorescein a pigment pyocyanin. Je původcem nozokomiálních nákaz, onemocnění močových cest, záněty středního ucha, různé hnisavé procesy a lokální infekce v popáleninách a bércových vředech či nebezpečné sepse. Patogenita kmenů *P. aeruginosa* spočívá v antifagocytární polysacharidové slizové vrstvě a produkci cytolytických exotoxinů, extracelulárních enzymů zvláště enzymů proteolytických, štěpících kasein, fibrin a kolagen, čímž poškozují stěny cév (Klaban 2018).

Rod *Legionella* zahrnuje bakterie, z nichž nejznámější je *Legionella pneumophila* subspecies (subsp.) *pneumophila*. Jedná se o gramnegativní pleomorfní druh vyskytující se ve formě kokoidní, tyčinkovité nebo vláknité v závislosti na podmínkách, ve kterých žije. Její životní cyklus se skládá z nepohyblivé replikační fáze a virulentní bičíkaté fáze. Vyskytuje se v půdě a ve vodě, odkud se formou kontaminovaného aerosolu dostává vdechnutím do člověka. Bakterie působí bronchopneumonie, záněty plic, legionářskou nemoc tzv. legionelózu nebo lehčí formu pontiatické horečky bez postižení plic. Většina legionel je spjata s biofilmem a v něm také detekována (Rogers, Dowsett et al. 1994, Fields, Benson et al. 2002, Klaban 2018).

Candida albicans je kvasinka z rodu *Candida*, která má schopnost tvořit biofilm a působit onemocnění kandidózy. V přírodě se nalézají v půdě a v exkrementech zvířat. U člověka se fyziologicky nachází např. na kůži, v dutině ústní, ve sputu, ve vaginálních

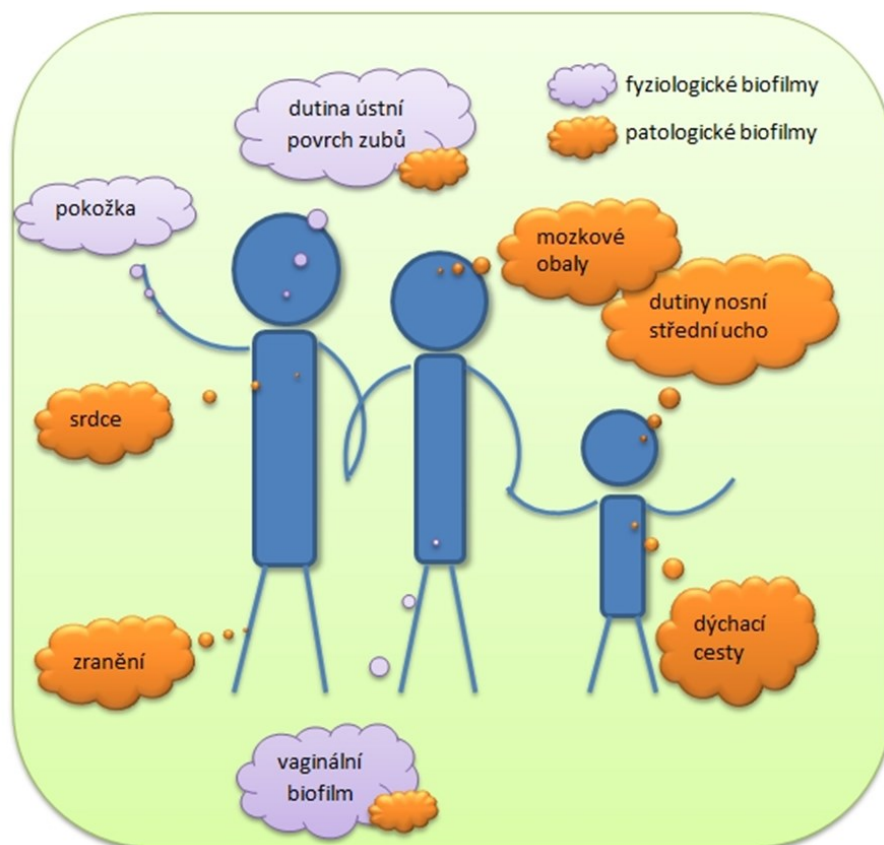
sekretech, výtěrech zvukodů, v moči a stolici, přítomna je také ve vodě bazénů. K jejímu průkazu slouží germinační test (tzv. test tvorby zárodečných klíčků). Její virulence je dána schopností tvořit zárodečné klíčky, biosyntézou enzymů fosfolipázy a proteinázy, konkrétně aspartylproteinázy (tzv. extracelulární proteolytická aktivita) a schopností přichycení (adheze, adherence) k epiteliálním buňkám (Hirota, Yumoto et al. 2017).

Mycobacterium tuberculosis je tyčinkovitá mykobakterie, která u člověka vyvolává onemocnění tuberkulózu. Patří do rodu *Mycobacterium* spolu s *Mycobacterium leprae* a dalšími tzv. netuberkulózními mykobakteriemi, které tvoří biofilm (*Mycobacterium avium* a *Mycobacterium smegmatis*). Virulence *M. tuberculosis* je dána jeho schopností produkovat glykolipid trehaloso-6,6'-dimykolát, tzv. cord factor, a způsobilostí přežít uvnitř makrofágů neimunních jedinců. *Mycobacterium tuberculosis* je zřejmě schopno tvořit biofilm, což dokázala studie autora Ojhy a kolektivu (Ojha, Baughn et al. 2008, Faria, Joao et al. 2015). Zda je biofilm přítomen v rozvoji tuberkulózy, bylo zkoumáno na plicích morčat. Kolonie připomínající biofilm byly pozorovány na okraji mineralizující centrální nekrózy (Lenaerts, Hoff et al. 2007).

6.4.2 Choroby jako důsledek tvorby biofilmu

Biofilm může být přítomen na mnohých částech lidského těla, např. na sliznicích, pokožce a zubní sklovině. Přirozená mikroflóra člověka je obvykle nepatogenní, naopak chrání člověka před patogeny z vnějšího prostředí. Její biofilm brání kolonizaci patogenními bakteriemi a vytvoření nového biofilmu. Navíc mohou fyziologicky přisedlé mikroorganismy chránit hostitele aktivně produkcí látek, jako jsou bakteriociny (Klaban 2018).

Obrázek 6-2 Příklad výskytu biofilmu na lidském těle



Zdroj: Klaban a další (přepracování z textu)

Tabulka 6-1 Výskyt hlášených infekčních onemocnění v České republice, jež by mohla být hypoteticky spojena s tvorbou biofilmu

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Bakteriální střevní infekce	2471	2831	3305	3178	3343	4607	5168	5797	6763	8146
Listerióza	78	51	37	32	26	35	32	35	37	34
Streptokoková septikémie	23	33	69	119	115	264	250	376	320	390
Jiné septikémie	343	431	670	861	824	926	1186	1154	1381	1604
Legionelóza	15	19	15	25	42	58	56	67	110	120
Růže - erysipelas	3561	3746	3631	3622	3503	3832	3773	3609	3822	3766
Bakteriální meningitída	145	168	141	154	130	149	160	150	122	121

Zdroj: Státní zdravotní ústav

6.4.2.1 Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) neboli mukoviscidóza je dědičné onemocnění. Pacienti se nyní díky léčbě dožívají okolo 40 let věku. Nemoc je způsobena autosomálně recesivní dědičnou mutací genu CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), který je lokalizován na dlouhém raménku sedmého chromosomu a řídí chloridový kanálek buněk rozličných orgánů. Výsledkem mutace je zvýšená propustnost pro sodné ionty a relativně nepropustná membrána pro chloridové ionty. Poruchou přenosu iontů se tvoří hlen, který je osídlován patogenními mikroorganismy. Vysoká koncentrace chloridových iontů snižuje antibakteriální ochranu bronchiální sliznice a vzniká perzistující infekce. Pro CF je typickým patogenem působící plicní infekce *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia*. Dalšími přítomnými zánětlivými mikroorganismy jsou *Staphylococcus aureus* a *Haemophilus influenzae* (Klener 2006, Hassett, Korfhagen et al. 2010, Waters a Smyth 2015).

Pseudomonas aeruginosa vytváří u pacienta s chronickou CF tlustý biofilm v dýchacích cestách. Exopolysacharid bakteriální alginát, hlen a DNA produkovaná neutrofilny tvoří stálý komplex, ve kterém se mění geny bakterií, jejich stavba a regulační systém, následně se uplatňuje QS (Hassett, Korfhagen et al. 2010, Waters a Smyth 2015).

Vyšetřováním vzorků z plic pacienta s CF bylo zjištěno, že nejčtenější skupinou přítomných buněk imunitního systému jsou neutrofilny, čítající 60-70 % všech buněk imunitního systému. Neutrofilní granulocyty infiltrují oblast na počátku onemocnění a hrají roli v patologickém procesu tím, že uvolňují proteiny jako je neutrofilní elastáza, jež poté působí proteolýzu. Proces vede k destrukci tkáně (Reeves, McCarthy et al. 2015).

Příčinou úmrtí pacientů s CF je snížená funkce plic, selhání dýchacího ústrojí a častá vzplanutí plicní choroby. Patogenezi CF značí zmenšený objem tekutého povrchu v dýchacích cestách a následné selhání mukociliární clearance, což má za následek hromadění vazkého hlenu, který je ideálním prostředím pro růst bakteriálních kolonií šířící zánět (Reeves, McCarthy et al. 2015).

6.4.2.2 Endokarditida

Endokarditida je život ohrožující choroba. Její podstatou je bakteriální nebo mykotické osídlení srdečních chlopní nebo endokardu srdce. Incidence vzrůstá a posti-

ženo je přibližně šest osob z 100 000 za rok ve věku 50-60 let (dříve okolo 40 let věku) a muži dvakrát častěji než ženy. Mortalita i dnes zůstává okolo 20-30 %, příčinou jsou však také komorbidity způsobené vyšším věkem pacientů (Klener 2006, Vojáček a Kettner 2009).

Endokarditida vzniká následkem spojení těla mikroorganismu s povrchem endotelu. Spojení je velice slabé, při jakémkoli poškození endotelu se však biofilm zesílí a může poškodit srdeční chlopně. Stav se účastní bakterie přítomné v krevním řečišti, např. některé stafylokoky, streptokoky, pneumokoky, druhy rodu *Candida* a některé gramnegativní bakterie. Mikroorganismy se do krve dostávají dýchacími cestami, gastrointestinálním a urogenitálním traktem. Adheze mikrobů probíhá výhradně na poškozený endotel, kde se hromadí červené krvinky, krevní destičky a fibrin. Buňky endotelu uvolňují fibronektin, který má schopnost vázat fibrin, kolagen, buňky a stejně tak bakterie. Druhy rodů *Staphylococcus* nebo *Streptococcus* mají pro fibronektin receptory a mohou v místě zranění tvořit silné biofilmy (Kokare, Chakraborty et al. 2009). Poškození endotelu a predispozice ke vzniku endokarditidy může být způsobena např. degenerativní chlopenní vadou, chlopenní náhradou, vrozenou srdeční vadou, hypertrofií a jiným poškozením srdce (Vojáček a Kettner 2009).

Nejčastějšími původci onemocnění na nativních chlopních jsou streptokoky, enterokoky a stafylokoky, především *Staphylococcus aureus*. Přítomna může být také *Neisseria gonorrhoeae* a *Haemophilus sp.* Gramnegativní tyčinky, např. pseudomonády, jsou významné u endokarditidy na chlopenních protézách. Onemocnění se sníženou letalitou působí bakterie *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* a *Kingella*. Mykotická endokarditida se vyskytuje u pacientů se silně oslabenou imunitou nebo dlouhodobou kanylací centrální žíly. U narkomanů jsou hlavním původcem stafylokoky a poté atypické mikroorganismy. U jedné čtvrtiny pacientů se nepodaří původce identifikovat (Klener 2006).

6.4.2.3 Bércové vředy a diabetická noha

Mikroorganismy tvoří biofilm také v ranách a zraněních. Poškození se pak pomalu hojí a stává se chronickým onemocněním. Biofilm bakterie *Staphylococcus aureus* je spojován např. se zraněními diabetické nohy, otlaků a bércových vředů. Celkově je *Staphylococcus aureus* detekován u 88-98 % případů nákazy ran. Podobně biofilm

Pseudomonas aeruginosa prodlužuje léčbu zranění a zvětšuje poranění. Analýza pomocí fluorescenční hybridizace in situ (FISH) odhalila, že biofilm bakterie *Pseudomonas* zůstává hluboko v ráně, kdežto biofilm *S. aureus* se vyskytuje na povrchu rány (Hansson, Hoborn et al. 1995, Bjarnsholt 2013, Gupta, Sarkar et al. 2016).

Chronické onemocnění žilní bérkový vřed ovlivňuje kvalitu života až jednoho procenta dospělých obyvatel. Vřed vyžaduje dlouhodobou léčbu a je napadán různorodými mikroorganismy. Studie na univerzitě v Brazílii v roce 2014 sledovala výskyt biofilmu tvořících se v průběhu onemocnění. Vzorky biopsie vředu byly zkoumány pomocí transmisního elektronového mikroskopu a biofilm rozpoznán pomocí matrix obklopující mikroorganismy. Ve 45 vzorcích se objevoval jeden nebo dva druhy z mikrobů *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* a *Escherichia coli*. Přítomnost biofilmu u vředů vysvětluje jejich neúspěšnou léčbu a přináší nové způsoby léčby (Honorato-Sampaio, Guedes et al. 2014).

Diabetes mellitus je chronické onemocnění rozšířené po celém světě a jednou z jeho vážných komplikací je syndrom diabetické nohy. Při testování pomocí multiplexní fluorescenční hybridizace in situ a testu na mikrotitrační destičce ve třech časech Mottola s kolektivem v roce 2016 získali informace o tvorbě biofilmu u tohoto syndromu. Největším původcem biofilmu byl v této studii *Pseudomonas aeruginosa*, následován rodem *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus* a *Enterococcus*. Vyšší schopnost tvorby biofilmu pak vykazovaly více druhové infekce (Mottola, Mendes et al. 2016).

Syndrom diabetické nohy studovali také na pacientech v Indii, kde je vysoký výskyt diabetu mellitu. Incidence diabetické nohy je zde mezi 8-17 %. Studie sledovala sto pacientů s věkem nad 18 let a u 38 z nich byl v infekční ráně detekován růst biofilmu. Biofilm bakterie rodu *Staphylococcus aureus* dominoval u dvaceti procent z celkového počtu, dále byl přítomen např. *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. Většina infekcí byla způsobena jedním mikroorganismem a vykazovala mnohočetnou lékovou rezistenci (Banu, Noorul Hassan et al. 2015).

6.4.2.4 Vaginální biofilm

6.4.2.4.1 Fyziologický biofilm

Přirozená mikrobiota a biofilmy jsou nezbytné v ženském pohlavním ústrojí, konkrétně ve vagíně, kde přisedají na epitelové buňky. Vaginálnímu prostředí dominuje biofilm grampozitivních bakterií z rodu *Lactobacillus*. Nejčastějšími druhy jsou *Lactobacillus jensenii*, *L. gasseri*, *L. iners* a *L. crispatus*. U zdravé ženy tyto laktobacily převládají a chrání oblast před nemocí či nepříjemným stavem, jež je obecně nazýván vaginální dyskomfort. Dyskomfort je často způsoben anaerobními bakteriemi nebo prvky, které mohou být přítomny přirozeně, a problémy vyvolávají při přemnožení (Patterson, Stull-Lane et al. 2010, Machado, Castro et al. 2015).

6.4.2.4.2 Vulvovaginální dyskomfort

Nejčastější vaginální onemocnění žen v produktivním věku je bakteriální vaginóza. Jejím znakem je snížený počet laktobacilů, zvýšené množství anaerobních mikroorganismů a zvýšení pH nad 4,5. Normální pH ve vagíně žen před menopauzou vykazuje hodnoty mezi 3,5 a 4,5. Vyšší hodnoty jsou vyvolány snížením množství laktobacilů, zvýšením množství patogenů, menstruací, nechráněným pohlavním stykem nebo antibiotickou léčbou (Patterson, Stull-Lane et al. 2010, Borges, Silva et al. 2011).

Dominantním původcem vaginózy je *Gardnerella vaginalis*, dále *Atopobium vaginae*, *Prevotella bivia*, *Veillonella sp.*, *Fucobacterium nucleatum* a *Bacteroides sp.* Společně vytváří silný biofilm, který imunitní systém ani běžná ATB nedokáže úplně zničit. Příčinou je tedy více mikroorganismů, jež se vzájemně liší schopností adherence k epitelovým buňkám a podobou biofilmu (Patterson, Stull-Lane et al. 2010, Machado, Castro et al. 2015).

Samotná *Gardnerella vaginalis* by působila vaginózu častěji než samostatně každý další přítomný mikrob. Je iniciálním kolonizátorem, protože má schopnost adheze na vaginální epitelové buňky a na ní mohou přisedat mikroorganismy, jež tuto schopnost nemají. Biofilm gardnerelly je velice silný a tuhý. Bakterie produkuje navíc vaginolysin, toxin, který lyzuje lidské červené krvinky a epitelální buňky a tím vytváří póry v epitelu. Bakterie je příčinou i jiných onemocnění. Ostatní anaeroby hrající roli během vaginózy disponují například pouze jednou ze tří schopností gardnerelly, mohou

mít jiné působení nebo se stávají patogeny až v přítomnosti dalších (Patterson, Stull-Lane et al. 2010).

6.4.2.5 Zubní plak

6.4.2.5.1 Zubní kaz

Dentální plak je biofilm vytvořený na povrchu zubu z mnoha mikrobiálních kolonií, polysacharidové hmoty s nukleovými kyselinami, z bílkovin a vody. Významnou dvojí úlohu tu hrají sliny. Sliny jsou hlavním zdrojem živin pro mikroorganismy, a zároveň vytváří ochranu proti zubnímu kazu. Vytvoření silného zubního plaku však zabrání prostoupení slin až k zubu a tím způsobí tvorbu zubního kazu (Overman 2000).

Zubní kaz je jedním z nejčastějších onemocnění mikrobiálního původu všech generací v populaci. Jeho hlavním původcem je *Streptococcus mutans*, který se podílí na tvorbě biofilmu a je běžně přítomen v dutině ústní. Tento grampozitivní kok rozkládá jednoduché sacharidy a uvolňuje organické kyseliny, především kyselinu mléčnou. Kyseliny poté demineralizují zuby a způsobují zubní kaz. *Str. mutans* má navíc schopnost vytvořit si ochranné polysacharidové pouzdro. Biofilm v dutině ústní není pouze na zubech, ale i na jejich podpůrných strukturách a na měkkých tkáních. Mezi další přítomné mikroorganismy patří *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis* a další. Nerovnováha mezi mikroorganismy se může projevit gingivitidou nebo periodontitidou (Mohammadi-Sichani, Karbasizadeh et al. 2016, Souza, Mota et al. 2016).

Autoři analyzovali souvislost mezi koncentrací sacharózy v potravě a schopností adheze *Str. mutans* a tvorbou biofilmu v dutině ústní. Disacharid sacharóza ovlivňuje složení biofilmu, množství bakterií a obsah extracelulárního ve vodě nerozpustného endoteliálního polysacharidu (EPC) v zubním plaku. Bakterie přítomné v ústech fermentují sacharózu, snižují pH biofilmů a tím mění jejich stabilitu a stávají se kariogenními. Sacharóza snižuje také množství fosforu, vápníku a fluoridu. Demineralizace pak poškozuje zubní sklovinu a dentin. *Str. mutans* pomocí glukosyltransferázy tvoří EPC, který vytváří podmínky pro adhezi a akumulaci kariogenních bakterií. Se vzrůstající koncentrací sacharózy stoupá a následně klesá kariogenní schopnost bakterií. V intervalu koncentrací 0,45 až 2,4 % je nejvyšší. Závislost tvorby zubního kazu na dávce

a frekvenci vystavení biofilmu sacharóze prokázalo více studií (Cai, Jung et al. 2016, Diaz-Garrido, Lozano et al. 2016).

6.4.2.5.2 Periodontitida

Periodontitida je onemocnění dásní způsobené bakteriemi *Fucobacterium nucleatum* a *Pseudomonas aerobicus*. Mikroby poškozují měkké tkáně i kosti držící zuby a proces může vyústit ve ztrátu zubu. Vznik problému obvykle podporuje chudá ústní a zubní hygiena (Lamont a Jenkinson 1998).

6.4.2.6 Otitida

Otitida neboli zánět středního ucha (*otitis media*) je běžné dětské onemocnění. Jsou dostupné různé metody léčby, přesto vědci hledají nové možnosti. Nemoc se často i přes zaléčení opakuje. Postihuje střední ucho, dutinu za ušním bubínkem, kde jsou přítomny ušní kůstky, Eustachova trubice vedoucí do nosohltanu, vzduchové buňky, a vnitřní ucho. Rozšíření nákazy k meningám a mozku, může mít vážné následky. Dutina je vystlána modifikovaným dýchacím epitelem s řasinkovými a pohárkovými buňkami. Epitel produkuje hlen, jenž běžně odchází do Eustachovy trubice (Qureishi, Lee et al. 2014).

Chronický zánět středního ucha charakterizovaný výpotkem vede k zánětlivé reakci organismu a ještě vyšší produkci hlenu, který narušuje očišťovací funkci vnitřního ucha. Je nejčastější příčinou ohluchnutí dětí ve vyspělém světě. Během posledních několika let bylo zjištěno, že jedním z hlavních stimulů zánětu je biofilm. Biofilm zde vytváří většinou *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae*. Je také příčinou návratu onemocnění (Hall-Stoodley, Hu et al. 2006, Mandel, Doyle et al. 2008, Daniel, Imtiaz-Umer et al. 2012).

6.4.2.7 Osteomyelitida

Osteomyelitida je zánět kosti bakteriálního nebo mykotického původu. Nákaza se do kosti dostane krevním řečištěm nebo zraněním. Leukocyty vstupují narušenou kostí dovnitř, kde se snaží sekrecí enzymů pohltnout bakterie. Dochází však k lýze kosti samé. Tvoří se hnis, který se šíří cévami kosti a tím zastavuje krevní průtok. Dominantním mikrobem onemocnění je *Staphylococcus aureus*. Má schopnost vázat se na fibrinogen, jenž je přítomný v dřeni kosti, a tvořit zde biofilm (Ziran 2007, Gupta, Sarkar et al. 2016).

6.4.2.8 Rhinosinusitida

Rhinosinusitida neboli zánět nosních dutin se projevuje bolestí v obličeji, hustým hlenem na nosní sliznici a drážděním nosní sliznice. Rhinoviry jsou příčinou nosních infekcí jako je nachlazení, zánět dutin je kromě toho spojován s bakteriemi *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae*. U chronické formy onemocnění se vyskytují také *Staphylococcus aureus* a *Moraxella catarrhalis* (Foreman a Wormald 2010, Stephenson, Mfuna et al. 2010). Právě u chronických forem je přítomen biofilm. Jedná se o velice časté onemocnění spojené s vysokými náklady z oblasti veřejného zdraví. Biofilm má velký význam na výskyt a průběh nemoci (Madeo a Frieri 2013).

6.4.2.9 Tuberkulóza

Přítomnost biofilmu byla pozorována během tuberkulózy vyvolané mikroblem *Mycobacterium tuberculosis* u morčat. Acelulární okraj primárního granulomu v plicní tkáni obsahoval kolonie extracelulárních buněk, které by mohly být určitým typem biofilmu. Prokázání těchto domněnek a vysvětlení přežívání těchto mikroorganismů by umožnilo hledat nový a účinnější způsob léčby tuberkulózy (Lenaerts, Hoff et al. 2007).

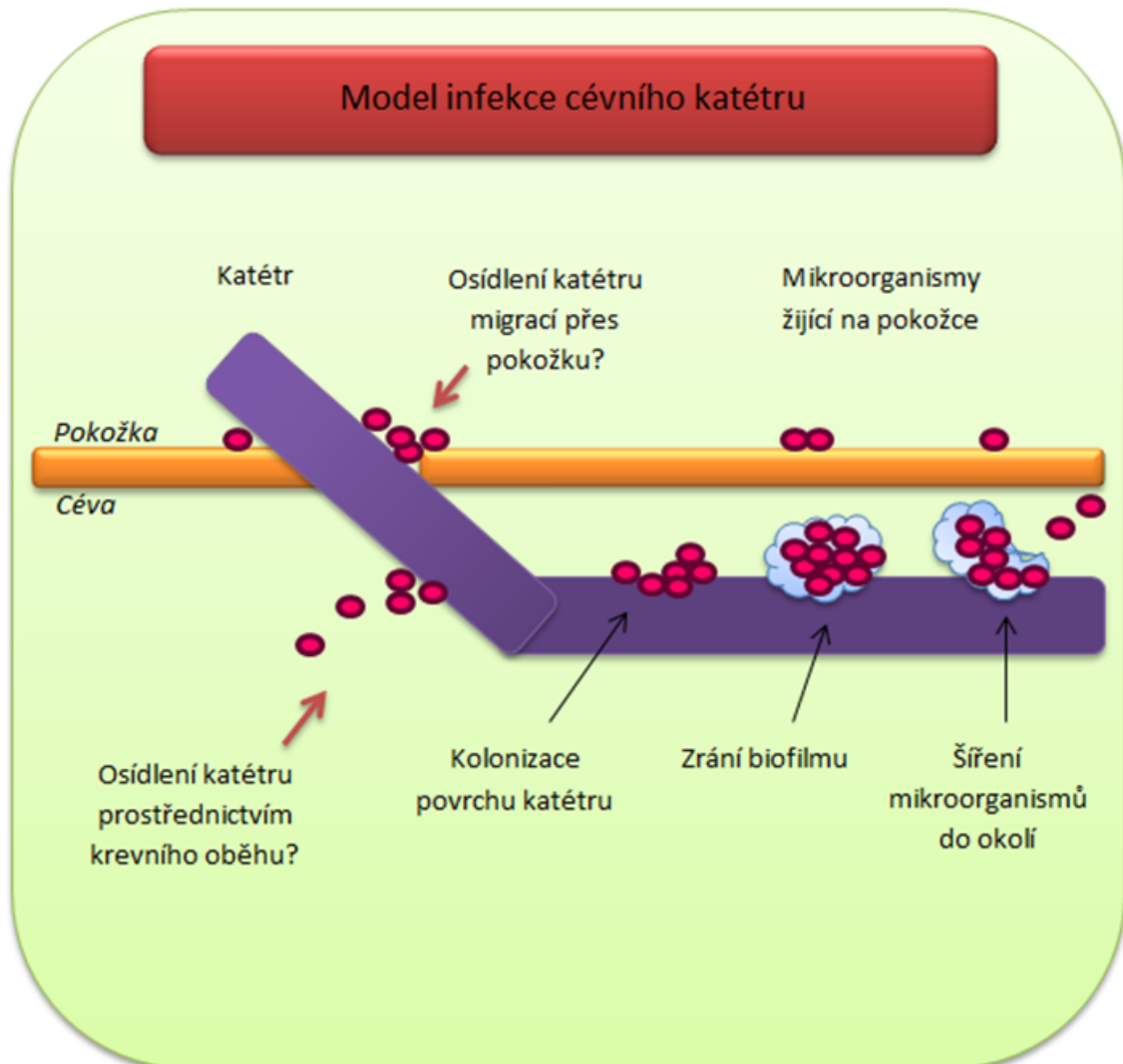
6.4.3 Tvorba biofilmu na katétrech, implantátech a dalších zdravotnických prostředcích

První onemocnění spojená s tvorbou biofilmu souvisí se zdravotními prostředky. Utváření biofilmu bylo zaznamenáno na kardiostimulátorech, kloubních protézách, dialyzačních zařízeních, žilních a močových katétrech. Tato zařízení se nedají nahradit a jsou pro život pacienta nezbytná. Dnes jsou nazývány jako chronické nákazy sdružené s polymery, nejčastěji jsou působené bakteriemi rodů *Staphylococcus* a *Pseudomonas* (von Eiff, Heilmann et al. 1999).

Centrální žilní katétr (CŽK) slouží k podání tekutin, léčbě, podání živin nebo sledování hemodynamické aktivity. Typickými mikroorganismy, které obydí tyto oblasti, jsou *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* a další. Biofilm může vyrůstat na vnějším povrchu katétru i uvnitř, což je běžné u delšího používání. Mikrobiální osídlování katétru nastává okolo 10 dnů od jeho zavedení (Gupta, Sarkar et al. 2016). Pokud se biofilm vytvoří na CŽK, nastává závažná situace. Pacient katétr potřebuje k přežití a zároveň

není mnoho možností kam katétre přemístit. CŽK může být zaveden pouze do *vena subclavia*, *vena jugularis interna* a *vena femoralis*.

Obrázek 6-3 Model infekce cévního katétru



Zdroj: Čermák, *Klinická mikrobiologie-biofilm* (přepřacováno)

Močové katétre, vyrobené z latexu nebo silikonu, se zavádí močovou trubicí do močového měchýře. Systém katétru může být otevřený nebo uzavřený. Právě otevřený systém, kde je moč odváděna na otevřené sběrné místo, je častěji kontaminován. Osídlování katétru pak může vyústit v zánět močového traktu. Bezpečnější je uzavřený systém s připevněným plastovým sáčkem. Typické mikroorganismy pro tuto oblast jsou *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* a některé gramnegativní bakterie (Kokare, Chakraborty et al. 2009).

Umělé srdeční chlopně mohou být osídlovány druhy *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, gramnegativními bacily, *Candida sp.*, *Enterococcus sp.* a difteroidy. Během chirurgického zákroku při náhradě chlopně může dojít k poškození tkáně a hromadění krevních destiček a fibrinu na švu a implantátu, k čemuž mají mikroorganismy vyšší afinitu než k přirozené zdravé tkáni. Po kolonizaci nastává tvorba biofilmu. Biofilm může vyústit v endokarditidu (Kokare, Chakraborty et al. 2009).

Místem kolonizace a tvorby biofilmu jsou také zavedená nitroděložní tělíska. Biofilm může i zde způsobit infekci. Kolonizátory jsou často *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, několik druhů *Corynebacterium*, *Enterococcus sp.* a další (Kokare, Chakraborty et al. 2009).

Povrch kontaktních čoček se může stát místem kolonizace *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, několika druhů rodu *Proteus*, *Serratia*, *Candida*, dále druhů *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. Tvorba biofilmu závisí na druhu polymeru, z něhož je čočka vyrobena, na vlastnostech čočky a kmeni bakterií (Kokare, Chakraborty et al. 2009, Gupta, Sarkar et al. 2016).

6.5 Profylaxe a léčba chorob spojených s biofilmy

6.5.1 Principy potlačení tvorby biofilmu

Biofilm se stál vědecky významným, závažným problémem ve zdraví populace. Tato forma života zvyšuje virulenci a patogenitu mnoha mikroorganismů a umožňuje jim přežít v různých podmínkách. Kvůli jeho virulenci a rezistenci je nutné hledat stále nové přístupy k prevenci a léčbě. Implantáty jsou např. obalovány antibakteriálními látkami a zkouší se stále nové kombinace antibiotických léků (Bjarnsholt 2013, Gupta, Sarkar et al. 2016).

Hledat nové možnosti léčby a bránit vzniku rezistence mikrobů je výzvou vědců po celém světě, tématem populace a světové zdravotnické organizace WHO. V posledních desetiletích výrazně vzrostl počet bakterií patogenních pro člověka, které jsou rezistentní na jedno nebo více ATB. Běžná léčba selhává a významná ATB ztrácí svoji účinnost (Frieri, Kumar et al. 2017).

Nové léčebné postupy zahrnují nové generace ATB, kombinovanou terapii, použití přírodních antibakteriálních látek a uplatnění nanočásticových systémů. Antibakte-

riální a biocidní látky jsou hodnoceny podle citlivosti bakterií a rizika vzniku rezistence (Frieri, Kumar et al. 2017).

Antibiofilmové působky by měly oslabit, rozrušit nebo usmrtit kolonie mikroorganismů uvnitř biofilmu, preventivně ničit planktonické bakterie před přisednutím či shlukováním a blokovat stavbu biofilmu. Na počátku tvorby biofilmu je vyvolán pouze mírný zánět, proto je velice těžké až nemožné toto stadium u pacienta zachytit. Když se zánět projeví, biofilm je často již přítomen a preventivní opatření jsou neúčinná. Tento princip je využitelný např. u onemocněních spojených se zavedením katétru nebo implantátu, kde se napadení mikroorganismy očekává. Principem působení může být oslabení matrix a tím vystavení doposud chráněných mikroorganismů působení antimikrobních látek. Jiným mechanismem účinku může být oslabení virulentních faktorů nebo signální dráhy QS. I tyto mechanismy jsou účinné jen u nezralého biofilmu, dokud se signální systémy neadaptují (Bjarnsholt, Ciofu et al. 2013). Specifické virulentní faktory jsou např. rhamnolipidy bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, alfa-hemolysin druhu *Staphylococcus aureus* a beta-laktamáza obou zmíněných zástupců. Při použití protilátky proti beta-laktamáze bylo zaznamenáno zlepšení plicních funkcí při léčbě cystické fibrózy pacientů s vysokým rizikem (Ciofu, Giwercman et al. 1995).

K odstranění biofilmu tedy vede snaha zabránit bakterii přichytit se k povrchu, použití sloučenin, které naruší tvorbu biofilmu a navození degradace vytvořeného biofilmu (Yang, Liu et al. 2012). Bylo vyvinuto mnoho metod k zabránění adheze bakterií k povrchům. Biochemický přístup zahrnuje navázání antimikrobní látky na daný povrch. Vazba látky k povrchu může být kovalentní či nekovalentní, popřípadě může být látka obsažena v hmotě povrchu. Dříve se využívaly antimikrobní peptidy navázané na mikroporózní fosfát kalcia, který obaloval titanový povrch. Účinkovaly proti gram pozitivním i gram negativním bakteriím, účinek byl však pouze krátkodobý (Kazemzadeh-Narbat, Kindrachuk et al. 2010, Yang, Liu et al. 2012).

Stálejší principy s delším působením se neustále vyvíjí. Příkladem mohou být jednoděnné uhlíkové nanotrubičky se silnou antimikrobní aktivitou nebo elektrické polymerní rohože se zabudovanými uhlíkovými nanotrubicemi s malým průměrem (Vecitis, Zodrow et al. 2010, Schiffman a Elimelech 2011). Blokáda adheze k povrchu bez mikrobicidních látek je také používána. Povrch se chrání před přichycením bakterií

prostřednictvím fimbrií. U druhu *Salmonella typhi* se osvědčil blok pomocí dvanáctimerního peptidu, který se naváže na strukturální protein fimbrií (Wu, Zhang et al. 2005). Hovězí laktoferin podobně váže pili *Burkholderia cenocepacia* a inhibuje její invazi (Ammendolia, Bertuccini et al. 2010).

Fyzikálně-chemické pojetí k zábraně adheze mikroorganismů k povrchům zahrnuje například použití elektrolyticky leštěné nerezové či jinak modifikované oceli (Arnold a Bailey 2000). Povrch z titanu může být modifikován pomocí tripeptidu a účinná proti adhezi je také pegylovaná forma (Khoo, Hamilton et al. 2009). Yuan a kolektiv otestovali navázání lysozymu na konce polyethylenglykolu monomethakrylátu na povrchu z nerezové oceli. Studie prokázala schopnost bránit bakteriální adhezi a usmrcovat druhy *E. coli* a *S. aureus* (Yuan, Wan et al. 2011).

Biologický přístup k blokádě adheze spočívá v inhibici jednoho mikroorganismu druhým. Jednou z hlavních řídicích sil je kompetice o potřebné substráty ve více druhovém biofilmu (Xavier a Foster 2007). Typickým příkladem biofilmu, který fyziologicky brání rozvoji patologického biofilmu, je zubní plak. Patologický biofilm *Streptococcus mutans* může být inhibován proteázami, které produkuje *Streptococcus gordonii*. Proteázy inhibují jeho signální dráhy (Wang, Deutch et al. 2011). Jiným příkladem inhibičního produktu proti *Str. mutans* je β -D-fruktosidáza z kultury *Streptococcus salivarius* (Ogawa, Furukawa et al. 2011).

Inhibice vývoje biofilmu spočívá v kompetici o substráty, působení na QS a další. Specifické rozrušení a prevence biofilmu *Staphylococcus epidermidis* je možné chelatací zinečnatých iontů. Dimerizace proteinů v přítomnosti zinku je nezbytná pro jejich funkci mezibuněčných adhezínů (Conrady, Brescia et al. 2008).

K rozrušení biofilmu mohou být použity sloučeniny působící na QS. Nové terapeutické postupy využívají QS ke kontrole virulence patogenního mikroorganismu. QS pomáhá také jako součást biotechnologických přístupů ke zlepšení průmyslové výroby např. ATB (Schauder a Bassler 2001, Bordi a de Bentzmann 2011).

Cílem anti-QS látek není zničit mikroorganismus, ale potlačit jeho útok, patogenní působení. Tím je posílena přirozená imunita napadeného organismu nebo posílí

jiný terapeutický přístup. Skutečný prospěch a využitelnost však musí být ještě dokázána (Hartmann a Schikora 2012).

Inhibitory QS se nachází volně v přírodě nebo jsou uměle syntetizovány a modifikovány. U biofilmu *P. aeruginosa* tak funguje např. azithromycin nebo výtažek z česneku (Hoiby, Bjarnsholt et al. 2010).

V posledních letech bylo identifikováno mnoho enzymů, které degradují signály vysílané QS. Mohou být aplikovány na povrch jako antibiofilmové působky. Jedním z novějších objevů je například N-acyl-homoserinlaktón-hydroláza, kterou z půdy izoloval a charakterizoval Bijtenhoorn a kolektiv. Enzym působí na N-acyl-homoserinlaktony, jež mají významnou roli v mezibuněčné komunikaci. Silně redukuje formování biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* (Bijtenhoorn, Schipper et al. 2011).

Jinou pomocí mohou být látky, které interferují s biosyntézou c-di-GMP. Tento druhý posel je důležitý u gramnegativních bakterií k produkci extracelulárních polysacharidů a stimuluje růst bakteriálního biofilmu. Sulfathiazol ze skupiny sulfonamidů působí proti biofilmu *Escherichia coli* inhibicí biosyntézy cGMP (Antoniani, Bocci et al. 2010).

6.5.2 Terapeutické postupy již používané v praxi

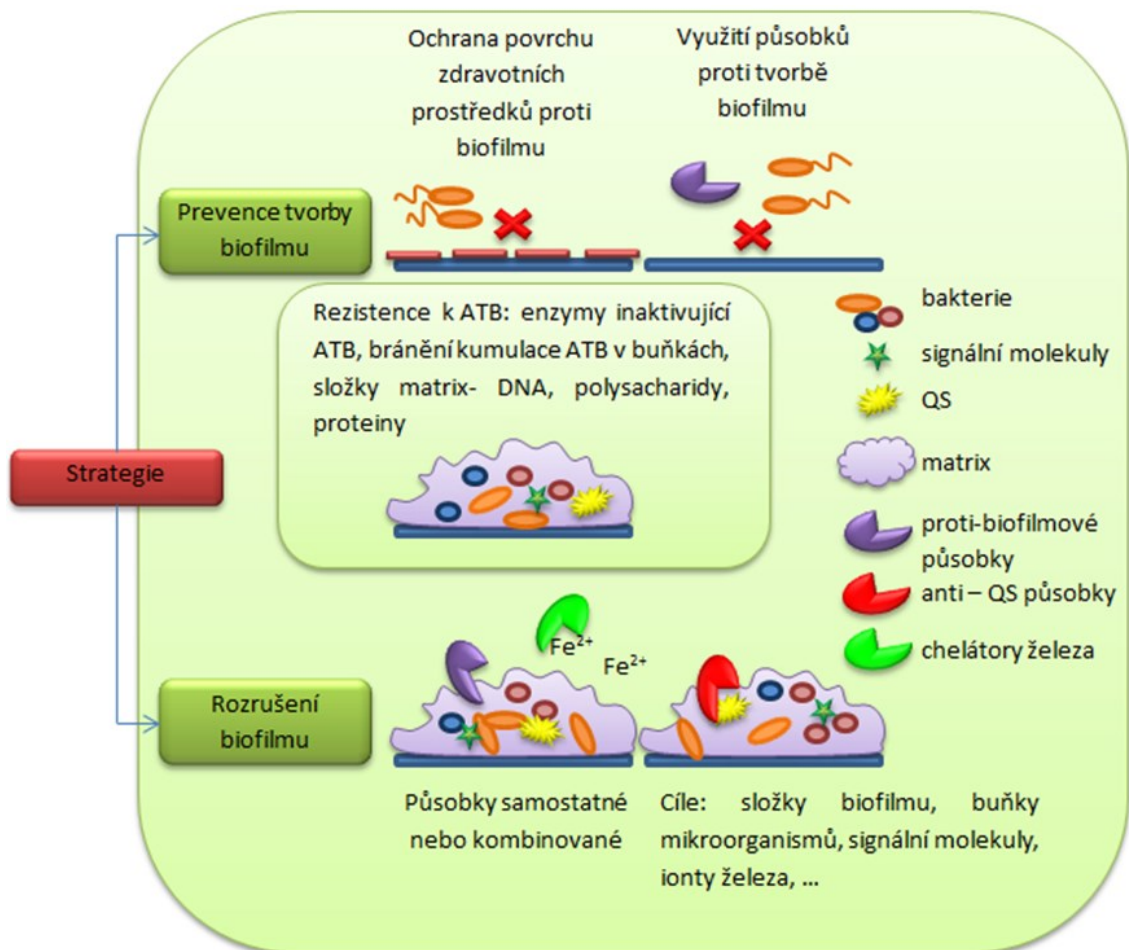
V současné době je v léčbě skutečně využívaná antibiotická léčba a chirurgické odstranění biofilmu. Nové přístupy, ačkoli byla *in vitro* nebo na zvířecích modelech prokázána účinnost, jsou ve stádiu vývoje. Potřeba je také zlepšit diagnostické metody chronických infekcí, které jsou působeny biofilmem (Bjarnsholt, Ciofu et al. 2013).

Jedním z mála úspěšných léčiv, která mohou být užita v kombinované léčbě infekcí způsobených biofilmem *Pseudomonas aeruginosa* je azithromycin. Jeho účinnost spočívá v útlumu nebo úplném potlačení produkce virulentních faktorů, jako jsou elastáza a rhamnolipidy, ovlivňuje polymerizaci alginátu a inhibuje QS (Hoffmann, Lee et al. 2007).

Obecně je antimikrobní léčba proti biofilmu neúčinná. Penicilin G a oxacilin mohou být použity k léčbě infekcí jako je osteomyelitida a jako antibiotická léčba první volby proti biofilmu *Staphylococcus aureus*. Dále jsou užívány také linezolid, daptomycin a vankomycin. Při nadměrném používání však vankomycin může být příčinou infek-

ce *Clostridium difficile*. Vankomycin bývá použit v kombinaci s rifampicinem. Vyšší účinnost inhibice biofilmu u infekcí v otevřených frakturách s implantátem byla zaznamenána také při použití ATB spolu s perličkami síranu vápenatého (Fraimow 2009, Archer, Mazaitis et al. 2011).

Obrázek 6-4 Možnosti působení proti tvorbě biofilmu



Zdroj: Ribeiro, Felicio et al. 2016 (přepřacováno z textu do obrázku)

Kombinace léčivých látek či jiných působků může mít v eliminaci biofilmu synergistický účinek. V kombinaci léků k terapii infekcí spojených s biofilmem se využívají látky účinné proti jednotlivým molekulám, konkrétně např. narušující membránu či syntézu proteinů, dále látky působící na složky matrix (polysacharidy, extracelulární DNA) a proti molekulám signálního systému (Bjarnsholt, Ciofu et al. 2013). Ne vždy je však kombinace ATB výhodná, v mnohých případech může selhat kvůli neschopnosti působit na biofilm nebo rezistenci vůči ATB buněk uvnitř biofilmu (Wu, Moser et al. 2015).

Jeden z nejstabilnějších biofilmů je vytvářen bakterií *Staphylococcus aureus*. Někdy musí být odstraňován chirurgicky a poté se podává např. vankomycin. Pacientům jsou podána ATB orálně, pokud je to nezbytné např. u muskuloskeletárních infekcí, jsou ATB podávána intravenózně. Pacienty je pak nutno monitorovat kvůli mnohým toxickým účinkům léčby (Osmon a Berbari 2002). *S. aureus* produkuje různé virulentní faktory, jako jsou toxiny, enzymy, adheziny a další bílkoviny, které mu umožní přežít v kritických podmínkách a šířit infekci tkáněmi dál (Frieri, Kumar et al. 2017).

6.5.3 Terapeutické postupy u konkrétních chorob spojených s biofilmy

6.5.3.1 Cystická fibróza

Léčba plicních nemocí pacientů s CF dosáhla mnohých zlepšení. Příkladem jsou aerosolové formy různých ATB jako je aztreonam k inhalaci. Je kombinován s lysinem na rozdíl od intravenózní formy, kde byl přítomen arginin. Ten sám mohl působit zánět v plicích. Po podávání během studií se zlepšily symptomy zánětu, jednovteřinová vitální kapacita plic (FEV_1) a hustota sputa způsobené *Pseudomonas aeruginosa*, neprokázaly se účinky u infekce způsobené bakterií *Burkholderia cepacia*. Tato bakterie se mezi lidmi přenáší, proto je vhodná izolace pacienta s tímto nálezem (Klener 2006, Waters a Smyth 2015). Mladý, nezesílený biofilm *Pseudomonas aeruginosa* je citlivý k léčbě pomocí DNáz. Vrstva polysacharidů chránící biofilm je ještě tenká. Poté biofilm zesílí a tvoří se více vrstev (Gupta, Sarkar et al. 2016).

Připraven byl také levofloxacin k inhalaci nebo amikacin v lipozomové formě. V suché práškové podobě k inhalaci je k dispozici tobramycin a kolistin. Výhodou těchto forem je vysoká koncentrace v plicích, ale rezistence se může i tak vyvinout. Zmírnit ji mohou pomocné látky a jiná léčba než antibiotická, jako je galium, česnek, antimikrobiální peptidy a látky působící proti biofilmu např. oligosacharidy alginátu (OligoG). Existují vakcíny a protilátková terapie (Waters a Smyth 2015).

Proti vyvíjení rezistence pomáhá neantibiotická léčba. Vakcína proti *Pseudomonas aeruginosa* brání rozvíjení infekce touto bakterií. Galium dokáže vystupovat jako železo a touto záměnou zastavit růst biofilmu *P. aeruginosa*. V kombinaci s lipozomálním gentamicinem je vysoce vystupňován účinek a jako vůbec jediný lék schopný plně vymýtit biofilm. Antimikrobní peptidy, defenziny, působí proti širokému spektru bakte-

rií a lyzují jejich buňky. Česnek obsahující allicin a ajoene působí na QS a značně zlepšuje výsledky léčby ATB (Waters a Smyth 2015).

6.5.3.2 Vaginální biofilm

Imunitní systém ani ATB nedokáže silný biofilm přítomný u bakteriální vaginózy zlikvidovat, proto se nemoc často opakuje, vrací, a stává se chronickou. ATB navíc působí negativně na přirozenou mikroflóru (Patterson, Stull-Lane et al. 2010, Machado, Castro et al. 2015). Léčba tohoto onemocnění tedy vyžaduje speciální přístup. Lékem volby je metronidazol, má však mnohé nežádoucí účinky. Používá se klindamycin a tinidazol, pokud metronidazol nebo klindamycin nejsou tolerovány. Při testování byla u většiny pacientů obecně prokázána rezistence, každá součást polymikrobiálního biofilmu však reaguje specificky. Především biofilm bakterií *Gardnerella vaginalis* byl po ukončení léčby přítomen. ATB ho jen dočasně potlačila. Stejně tak se neosvědčila léčba moxifloxacinem (Swidsinski, Dorffel et al. 2011, Machado, Castro et al. 2015).

Laktobacily udržují rovnováhu mikrobioty nejen ve vaginálním, ale také močovém a gastrointestinálním ústrojí, při kožních infekcích a zavádění katétrů. Jejich využití při léčbě má mnohé výhody. Jako přirozené mikroby jsou dobře snášené a vykazují nízkou toxicitu. Probiotická léčba laktobacily je perspektivní možností léčby. Produkují navíc antimikrobně působící látky, jako jsou organické kyseliny, konkrétně kyselinu mléčnou, která udržuje kyselé pH vagíny. Dalšími produkty jsou peroxid vodíku, bakteriociny a jiné důležité produkty jako jsou inhibitory adheze, povrchově aktivní biosurfaktanty, tedy látky bránící tvorbě biofilmu (Patterson, Stull-Lane et al. 2010, Borges, Silva et al. 2011, Shokouhfard, Kermanshahi et al. 2015, Ventolini 2015).

Prvním mechanismem působení laktobacilů je blokáda adheze k epitelii, druhým mechanismem pak produkce antimikrobních substancí. Dokážou rozrušit biofilm vytvořený nepřírodně při bakteriální vaginóze. Někdy jsou podávány pouze jako doplňková léčba k ATB, které poškozují přirozenou mikroflóru. Prebiotika jsou látky, které pomáhají růstu probiotických mikroorganismů a mohou být k léčbě alternativně použity. Urychlují obnovení správného složení vaginálního biofilmu (Machado, Castro et al. 2015).

Ventolini s kolektivem testovali účinek biofilmu *Lactobacillus jensenii* ze vzorků získaných od asymptomatických pacientek po dokončení antibiotické léčby bakteriální

vaginózy. Vzorek laktobacilu získaný vaginální biopsií dokáže formovat biofilm in vitro. Ventoliniho skupina provedla dokumentaci tvorby biofilmu in vivo. Celkově je důležité, že je možné biofilm izolovat, kultivovat a pak využít k prevenci vaginóz (Ventolini 2015).

Použití rostlinných přípravků je na vzestupu. Tyto přípravky zmírňují symptomy tvorby biofilmů a jsou dobře tolerované. Inhibici biofilmu mikroorganismu *Gardnerella vaginalis* thymolem obsaženým v silici tymiánu prokázali Braga s kolegy v roce 2010. K dispozici jsou krémy s výtažky z rostlin, vaginální pesary nebo česnekové tablety (Machado, Castro et al. 2015).

Jiným přístupem k léčbě vaginálních infekcí může být ovlivnění pH vaginálního prostředí. Snížit infekcí zvýšené pH, tedy okyselit, můžeme prostředím např. kyselinou octovou nebo mléčnou ve formě mýdla nebo roztoku. Lze využít také pufovací činidla jako je polykarbofil. Upravený dokáže inhibovat růst škodlivých biofilmů (Machado, Castro et al. 2015).

6.5.3.3 Zubní plak

Cílem prevence a léčby zubního kazu i parodontózy je eliminovat přítomnost *Streptococcus mutans* a jiných patogenních bakterií. Dentální plak je však chrání proti antimikrobiálním látkám (Mohammadi-Sichani, Karbasizadeh et al. 2016).

Zubní kaz a jiní původci mohou infikovat kořenové kanálky zubu. Endodoncie se snaží eliminovat biofilm a vymýtit mikroby. Dříve se používaly látky chemické, jako je chlorhexidin nebo ethylendiamintetraoctová kyselina, které však porušovaly dentin a jiné struktury zubu. Přechází se k přírodní léčbě kořenových kanálků. Mezi využívané extrakty rostlin může patřit například výtažek z *Aloe vera*, který je do jisté míry antibakteriální a protizánětlivý. Jako přírodní ATB slouží propolis účinný proti *Enterococcus faecalis* a *Candida albicans*. *Cinnamomum zeylanicum* působí díky přítomnosti eugenolu antibakteriálně na *Streptococcus mutans* a *Enterococcus faecalis*. Další extrakty vhodné k výplachu jsou *Allium sativum*, *Matricaria recutita*, *Zingiber officinale*, *Camelia sinensis*, *Citrus Paradisi*, *Glycyrrhiza glabra*, *Myrtus communis*, *Copaifera multijuga*, *Myristica fragrans*. Mají antibakteriální účinky, některé navíc ještě antifungální, antioxidační, anestetické nebo antiedematózní. Jejich výsledky při užití jsou nadějně. Kombinací extraktů se účinek zvyšuje (Venkateshbabu, Anand et al. 2016).

Rostlinná léčba je často testovanou a využívanou metodou léčby zubních plaků. Mohammadi a kol. testovali účinky extraktu z duběnek z iránských druhů stromu *Quercus infectoria* na růst biofilmu *Streptococcus mutans*. Dokázali, že extrakt má silné inhibiční účinky na tento biofilm. Je tedy potenciálním zdrojem antibakteriálních a protinfekčních činidel (Mohammadi-Sichani, Karbasizadeh et al. 2016).

6.5.4 Užití nanočástic kovů v potlačení tvorby biofilmu

Nanočástice kovů stříbra, zlata, mědi, železa a jejich oxidy se mohou uplatnit jako aktivní terapeutické přípravky nebo jako nosiče léčiva do místa infekce. Extracelulární polymerní hmota biofilmu brání průniku molekul léčiva dovnitř biofilmu. Rozměry nanočástic přináší unikátní fyzikální i chemické vlastnosti. Výhodou nanočástic je velký povrch a urychlené rozpouštění, což je základem pro antimikrobní účinek látek založených na stříbře, kdy jsou ionty stříbra účinnou látkou (Ribeiro, Felicio et al. 2016, Wang, Gupta et al. 2016). Jako nosiče se nanočástice uplatní především u ve vodě nerozpustných léčiv, kdy se výrazně zvýší průnik léčiva do biofilmu. Léčivo je pouze zabudováno do částice bez potřeby modifikovat, další výhodou je kontrolovatelná velikost částic. Tuross a kolektiv testovali např. polyakrylátové nanočástice s N-methylthio- β -laktamy (Tuross, Shim et al. 2007).

Navázaný oxid dusnatý je dalším příkladem využití nanočástic. Oxid dusnatý je účinnou antimikrobiální látkou a nanočástice mu slouží jako nosič. Působí zvýšením reaktivních volných radikálů podobně jako zánětlivé buňky. Materiál nanočástice nesmí s oxidem dusnatým interagovat, využívá se například oxid křemíku. Hetrick s kolektivem testovali *in vitro* biofilmy bakterií *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Candida albicans*. Jejich studie ukázala, že oxid dusnatý usmrtil 99 % buněk uvnitř biofilmu, nejúčinnější je oxid dusnatý proti gramnegativním bakteriím (*P. aeruginosa* a *E. coli*), kde byl výsledek eradikace více než 99,99 %. Test toxicity prokázal nižší útlum fibroblastů než po podání jiných antiseptik, jako je chlorhexidin (Hetrick, Shin et al. 2009).

Studie ukázaly, že průnik nanočástice do biofilmu záleží na náboji částice a hydrofobitě. Anionty a neutrální částice nebyly schopny průniku do biofilmu, kdežto kationty prokázaly vysokou schopnost penetrace a akumulace uvnitř biofilmu. Nanočástice může být pokryta kladně nabitým pláštěm a uvnitř může být hydrofobní pro

řízené uvolňování. Hydrofobní částice vědci pozorovali i uvnitř bakterií, hydrofilní částice se vyskytovaly pouze v extracelulární matrix (Wang, Gupta et al. 2016).

Nanočástice z chitosanu pak navíc mají schopnost remineralizace dentinu, pro niž se využívají v endodoncii. Chitosan je antimikrobní látka inhibující biofilm tvořící se na vrstvě dentinu a zároveň se váže prostřednictvím fosfátové vazby na ionty vápníku v dentinu. Vytvořená vrstva fosforečnanu vápenatého napravuje demineralizovaný dentin a skvrnitá vrstva mizí (Del Carpio-Perochena, Bramante et al. 2015).

U chronických ran byl testován účinek lokálních antibakteriálních obkladů. Úspěch byl zaznamenán u ran infikovaných *Pseudomonas aeruginosa* i kombinací patogenů *Pseudomonas aeruginosa* společně s bakterií *Staphylococcus aureus*. Obklad testovaný ve studii Setha a kolektivu obsahoval stříbrné ionty, kyselinu ethylendiamintetraoctovou a benzethoniumchlorid. Ionty stříbra působí antimikrobně, samotné by však proti biofilmu neobstály. Kyselina ethylendiamintetraoctová posiluje schopnost iontů a benzethoniumchlorid pomáhá při rozrušení biofilmu (Seth, Zhong et al. 2014).

Nanočástice stříbra a obecně stříbro v různých podobách je antimikrobně využíváno již od nepaměti. Různé druhy krytí na špatně se hojící a chronické rány se běžně v terapii užívá a doporučuje. Pomáhá při hojení popálenin, špatně se hojících zranění diabetiků a dalších diagnózách. Zmiňován je však pouze účinek obecně antimikrobní, proti planktonickým bakteriím, nikoli význam proti tvorbě biofilmu.

6.5.5 Substance proti biofilmu na bázi peptidů

Další rozvíjející se možností léčby jsou syntetické antimikrobiální peptidy účinné proti volně žijícím bakteriím i bakteriím tvořící biofilm. Tyto látky prokázaly vliv i na multirezistentní bakterie. Endogenní kationické peptidy jsou jedním z obranných mechanismů organismu, na něž si bakterie nedokáží vytvořit rezistenci. Jednotlivé peptidy se liší účinností, rozdílem v působení na grampozitivní a gramnegativní bakterie nebo např. v prostupu přes bakteriální membránu (Tan, Wu et al. 2017). Bylo vymezeno velké množství přírodních i syntetických peptidů, které působí proti vzniku biofilmu. Následně se účinek zlepšoval převedením peptidů do formy léku. Proces zahrnoval snahu zvýšit antimikrobní a imunomodulační aktivitu, redukci toxicity, zmenšení molekuly a vytvoření odolné formy proti proteázám hostitele. Úpravy se týkaly především

specifických aminokyselin, druhou možnost zahrnovala syntéza sloučenin na bázi peptidů (Mojsoska a Jenssen 2015).

Peptidy lze využít také při antimikrobiální ochraně zdravotních prostředků. Příkladem může být zkoušený fúzní peptid složený ze dvou částí, z kolagen-mimetického peptidu a kationického antimikrobiálního peptidu. Povrchy potažené peptidem pak prokazovaly aktivitu proti tvorbě biofilmu (Li, Contreras-Garcia et al. 2015).

6.5.6 Vliv na biofilm jiných registrovaných léčiv než ATB

Látky, jež by potlačily tvorbu biofilmu, byly hledány i mezi schválenými léčivými látkami z jiných terapeutických skupin. Utváření biofilmu druhů *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* potlačily protizánětlivé látky ze skupiny nesteroidních antiflogistik (NSAID), diklofenak a ibuprofen (Reslinski, Dabrowiecki et al. 2015). Biofilm druhu *Candida albicans* je také inhibován protizánětlivými látkami jako je kyselina acetylsalicylová, diklofenak a etodolak, méně pak působí ibuprofen a další NSAID. Tyto látky blokují syntézu prostaglandinů a právě tu tvoří i zmíněné kvasinky. Prostaglandiny jsou zřejmě podstatné pro vytvoření biofilmu a další růstové procesy kvasinky. Alem a Douglas předpokládají, že potlačení růstu biofilmu souvisí s inhibicí prostaglandinů, ačkoli mechanismus není plně objasněn. Jejich použití v kombinaci může být výhodné (Alem a Douglas 2004). Aktivitu proti biofilmu projevily také látky ze skupiny cytostatik a anti-depresiv. 5-fluorouracil, užívaný proti rakovině, redukuje biofilm a virulenci *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Působí potlačením genové exprese genu, který reguluje biofilm a rezistenci vůči kyselinám (Attila, Ueda et al. 2009). Maprotilin ze skupiny antidepresiv vykazuje účinek proti biofilmu bakterie *Francisella novicida*. Inhibuje její dvousložkový signální systém (Dean a van Hoek 2015).

Na druhou stranu Dotto a kolektiv studovali spojitost mezi kyselinou salicylovou a růstem biofilmu *Staphylococcus aureus*. Jejich studie ukazuje v přítomnosti kyseliny salicylové zvýšený nárůst této bakterie v dýchacích cestách hlodavců. Kyselina salicylová mění metabolismus bakterií, příkladem může být zvýšená produkce laktátu (fermentace), který váže železo a zvyšuje expresi různých genů vedoucí k zvýšené tvorbě biofilmů a k rezistenci bakterií. Je možné, že si lidé často užívající aspirin obsahující derivát kyseliny salicylové neúmyslně podporují rozvoj chronických infekcí (Dotto, Lombarte Serrat et al. 2017).

Světovým problémem se staly infekce způsobené bakteriemi druhu *Pseudomonas aeruginosa*, jež jsou producenty biofilmu, a které jsou odolné vůči mnohým léčivým látkám včetně fluorochinolonů. Autoři řešili otázku, zda běžně podávané blokátory vápníkových kanálů, konkrétně diltiazem, ovlivňuje spolu s podávanými fluorochinolony růst biofilmu této bakterie. Studie prokazuje, že diltiazem může vyvolat rezistenci na použitá ATB (Elkhatib, Haynes et al. 2008). Biofilm *P. aeruginosa* je rozrušen např. látkami vázajícími železo spolu s aminoglykosidy (Bordi a de Bentzmann 2011).

6.5.7 Přírodní látky ovlivňující biofilm

Annapoorani a kolektiv provedli virtuální screening sloučenin na základě struktury, aby našli strukturálně vhodné inhibitory QS. Kyselina rozmarýnová, uvolňovaná kořeny rostliny *Ocimum basilicum*, tlumí podle následující studie QS biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* inhibicí receptorů pro určité proteiny. Podobně se osvědčily i sloučeniny naringin, chlorogenová kyselina a morin (Annapoorani, Umamageswaran et al. 2012). Allylsulfid (ajoene) izolovaný z česneku má vliv na geny pro QS *Pseudomonas aeruginosa*. Synergicky vystupuje spolu s tobramycinem u plicních infekcí (Jakobsen, van Gennip et al. 2012). Zázvor tuto bakterii také ovlivňuje snížením produkce cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) a celkově polysacharidů (Kim a Park 2013).

Singh v roce 2002 prokázal, že laktoferin, chelátor železa, inhibuje růst biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*. Metabolismus kovů má klíčovou roli v signálních drahách biofilmů i v produkci virulentních faktorů (Singh, Parsek et al. 2002).

Pseudomonas aeruginosa uvolňuje cis-2-dekanovou kyselinu, která dokáže rozrušit biofilm mnohých bakterií jako je *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans* (Davies a Marques 2009).

6.5.7.1 Chmel a jeho účinky na biofilm

Chmel otáčivý, latinsky *Humulus lupulus*, je vytrvalá bylina z čeledi konopovitých. Rostlina poskytuje drogy, které jsou v evropském lékopise uvedené jako *Lupuli flos*. Významnými obsahovými látkami jsou chinony humulon a lupulon. Další obsahovou látkou je xanthohumol (XTH), což je chemicky prenylovaný chalkon. Tradičně má chmel využití jako amarum, stomachikum a sedativum (Jahodář 2009).

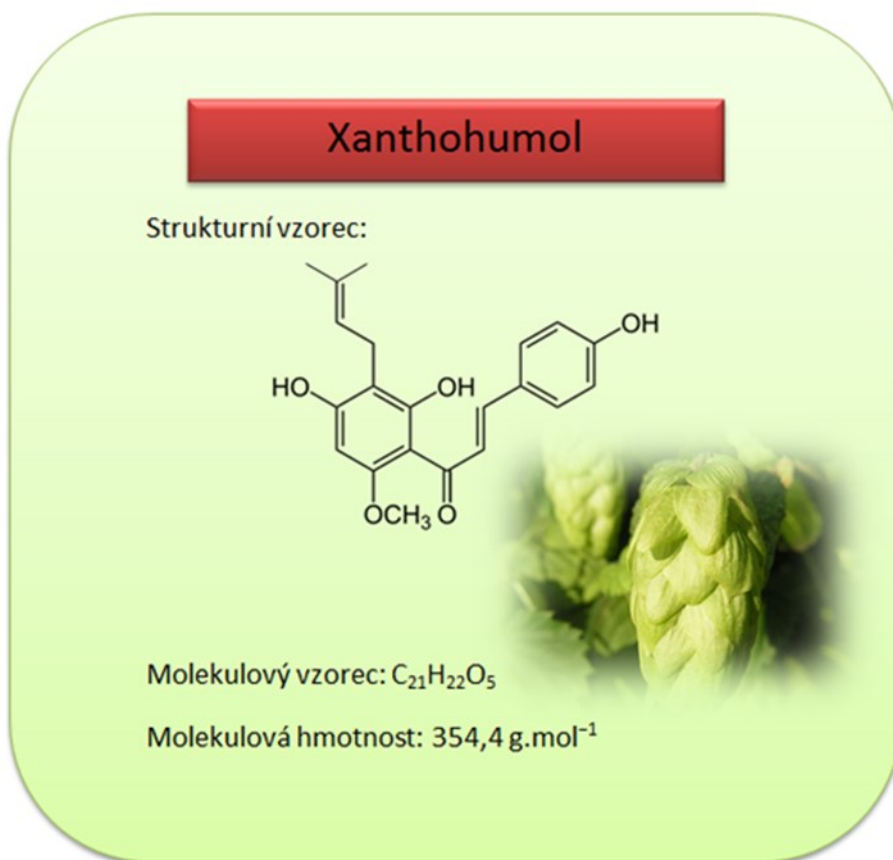
Obsahové látky chmelu mají prokázaný antibakteriální, antivirový a antifungální účinek. Uplatnění by mohly najít také proti původci malárie, proti prvoku *Plasmodium falciparum*. Obsahové látky chmelu však nepotlačují růst kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* nebo bakterie *Escherichia coli* (Gerhäuser 2005). Výrazný antibakteriální účinek prokazují obsahové látky chmelu proti grampozitivním bakteriím. Kramer a kolektiv testovali *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes*, kdy byl účinek vyšší než na bakterie *Escherichia coli* a *Salmonella enterica* (Kramer, Thielmann et al. 2015). Cílem naší práce bylo zjistit, zda tyto substance, konkrétně XTH, dokáží ovlivnit či zabránit tvorbě biofilmu.

Obsahové látky chmelu nepůsobí na gramnegativní bakterie, což je dáno uspořádáním a permeabilitou buněčné membrány mikroorganismu. Chmelové extrakty jsou inhibitory lipidového metabolismu. XTH působí jako inhibitor enzymu diacylglycerol-acyltransferázy (Rozalski, Micota et al. 2013).

XTH je žlutooranžová krystalická látka. Ve vyšších koncentracích u něho byl prokázán antioxidační, antiinfekční a antikancerogenní účinek. Během výroby piva však vlivem varu a omezené rozpustnosti ve vodě dochází k výrazným ztrátám (Jelínek, Karabín et al. 2013).

Abreu a kolektiv popsali schopnost XTH a lupulonu potencovat účinek antibiotických látek, konkrétně polymyxinu B, tobramycinu a ciprofloxacinu proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Schopnost spočívá ve změně permeability membrány bakterií (Abreu, McBain et al. 2012).

Obrázek 6-5 Strukturní a molekulový vzorec a molekulová hmotnost xanthohumolu



Zdroj: Daidalea

6.5.8 Vliv živých mikroorganismů

Fágy jsou předpokládanou alternativou k antibiotické léčbě nebo ke zlepšení konvenční léčby. Jsou specifické a nepoškozují prostředí, kam jsou aplikovány. Příkladem postupu může být studie Carsona a kolektivu, kteří prokázali účinek lytických bakteriofágů proti biofilmům *Proteus mirabilis* a *Escherichia coli*. Fágy mohou být aplikovány také do hydrogelem potažených katétrů a bránit tak vzniku biofilmu. Úspěch aplikace byl okolo 90 % (Carson, Gorman et al. 2010).

6.5.9 Ochrana zdravotnických prostředků

Slobodníková a kolektiv ověřovali účinnost dezinfekčních přípravků používaných na kůži a sliznice proti růstu biofilmů *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* a *Candida tropicalis*. Konkrétně testovali chlorhexidin diglukonát, jodpovidon, oktenidin hydrochlorid a superoxidovanou vodu. Typicky tvoří tyto mikroorganismy biofilm na katétrech. *In vitro* prokázal nejvyšší aktivi-

tu oktenidin, kterým byl potlačen růst téměř všech biofilmů, nicméně *Candida tropicalis* zůstává problémem. Tento mikroorganismus tvoří na povrchu katétrů hrubé biofilmy, které spolehlivě chrání mikroorganismy uvnitř biofilmu (Slobodníková, Hupková et al. 2014).

Antimikrobiální technika zámku (ALT-antimicrobial lock technique) může být použita k zastavení růstu biofilmu na katétrech. Velké množství antibakteriální, přednostně baktericidní látky, je implantováno na povrch katétru. Nevýhodou je toxicita a možnost sekundární infekce právě kvůli nutnosti velké dávky. Byly testovány různé látky, např. chelatační činidla a ethanol. Kombinace látek může působit synergicky. Eliminace biofilmu však skutečně prokázána nebyla, neboť výsledek je založen na negativních výsledcích krevních kultur a klinických symptomů pacientů (Bordi a de Bentzmann 2011).

Materiál může být před přilnutím bakterií chráněn pomocí kovů. Nejvíce testované je v tomto směru stříbro. Zabudováním iontů stříbra do polyethylenových vrstev se materiál stává antimikrobním. Tento přístup je zkoušený v krytí na popáleniny (Khundkar, Malic et al. 2010).

Silikon potažený triklosanem odolává z 99 % vzniku biofilmu *Escherichia coli* a rovněž inhibuje biofilm tvořený *Staphylococcus epidermidis*. Antimikrobní peptid mangainin byl izolován z drápatky vodní (*Xenopus laevis*) a usmrcuje grampozitivní i gramnegativní bakterie. V určitých případech brání adhezi mikroorganismů k povrchu (Humblot, Yala et al. 2009). Silikon společně s kvartérním amoniovým silanem z 90 % redukuje růst stafylokoků a u gramnegativních bakterií byl růst biofilmu potlačen ze 65 % (Gottenbos, van der Mei et al. 2002). Kuličky pryskyřice potažené oxidy polyethylenu nebo peptidy, jako je arginylglycylaspartová kyselina, snižují bakteriální infekci a potlačují růst biofilmu. S použitím určitých peptidů byl zaznamenán pokles biofilmové infekce o 88-98 % u mikrobů *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans* a *Staphylococcus epidermidis* (Bruellhoff, Fiedler et al. 2010).

Bránit mikroorganismům v šíření po povrchu mohou také mikroskopicky brázděné materiály. Gloag s kolektivem takto v roce 2016 sledovali šíření a usměrnění růstu biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* a *Proteus vulgaris* do vytyčených drah. Při použití brázd s rozměry 5–10 µm široký, 1 µm hluboký a 10–20 µm mezi brázdami bylo

dokázáno největší potlačení expanze. I toto je potenciální možnost zacházení s biofilmy (Gloag, Elbadawi et al. 2016).

Antibakteriální účinek vykázal při studii také lipofosfonoxin DR5026 vázaný na kostní cement. Tvorba biofilmu *Staphylococcus epidermidis* byla potlačena. Autoři tak přináší novou možnost náhrady používaného cementu s vázaným ATB, který je často rizikový. Je však třeba provést další testy toxicity a stability před zavedením do praxe (Večeřová, Bogdanová et al. 2016).

V dutině ústní se k pomocné léčbě mohou využít implantáty z různých materiálů. Na nich se vytváří specifický biofilm, který je závislý na ústní mikrobiotě, povrchu, ale také na pH, živinách a kyslíku v dutině ústní. Používají se protézy z titanu, porcelánu, slitiny chromu a kobaltu, implantáty ze zirkonia stabilizovaného s ytriem. Studie ukázaly, že nejvíce kolonií se vyskytuje na slitinách chromu a kobaltu. Tyto výsledky byly dokázány měřením absorbance i počítáním kolonií na cm^2 (colony forming unit, $\text{CFU}\cdot\text{cm}^{-2}$). Titan a jeho sloučeniny byly pro své mechanické vlastnosti velmi důležitým používaným materiálem. Jejich výhodou je odolnost proti korozi, biokompatibilita a pevnost v tahu. Nyní se mnozí badatelé snaží vyvinout nové materiály s použitím zirkonia, které by měly být lepší po stránce estetické a současně i redukovat tvorbu biofilmu. Po 24 hodinách se na titanu vytváří nejméně kolonií z testovaných materiálů (Souza, Mota et al. 2016).

6.6 Biofilmy v přírodním prostředí a využití biofilmu v biotechnologických procesech

6.6.1 Biofilmy v přírodním prostředí

Biofilm se obecně podle výskytu dělí na *in vivo* (lidské tkáně, tkáně savců i bezobratlí), *in vitro* (přírodní prostředí-epilimon, biofilm na kořenech rostlin-rhizosféra, na listech rostlin-fylosféra) a vytvářený za biotechnologickým účelem. Biofilm může mít pozitivní i negativní význam. Jako příklad lze uvést přirozený biofilm na listech rostlin, který zabrání tvorbě patogenního biofilmu, jenž by způsobil chorobu, a mnohé další (Klaban 2011).

Biofilmy se tvoří na různých částech lidského těla, na potravinách a ve vodě, což jsou základní potřeby každodenního života. Podílí se na tvorbě a degradaci organického materiálu, nitrifikaci nebo čištění vody (Massol-Deya, Whallon et al. 1995).

Biofilmy se běžně vyskytují ve vodním prostředí na povrchu kamenů (epilíton), na ponořených cizích předmětech ve zkoumané vodě jako je např. sklíčko (perifyton), na větvích a dřevě (epixylický biofilm), na bahenních dnech (epipelický biofilm) a na vnitřních stěnách potrubí. Jsou to dynamické struktury, jež se lehce přizpůsobují (Klaban 2011).

Biofilm ve vodním prostředí je nazýván také nárost a je tvořen společenstvím bakterií, sinic a řas spolu s vyššími organismy jako jsou bičíkovci (*Flagellata*), larvy, rozsivky (*Bacillariophyceae*) a nálevníci (*Ciliata*). Ne všechny bakterie dokáží ve vodě žít. Jejich buňky se zmenší a pouze přežívají, dokud se nepřichytí na povrch, což je usnadněno jejich hydrofobním povrchem. Biofilm jako dynamická struktura se přizpůsobí laminárnímu i turbulentnímu proudění vody (Klaban 2018).

Bakterie v pitné vodě mají díky biofilmu k dispozici větší množství živin než v okolní vodě a zajištěnou ochranu vůči dezinficiencím. Vědci dokázali, že *Mycobacterium avium*, *Legionella pneumophila* a psí *Calicivirus*, jako náhrada noroviru působícího onemocnění lidí, dokáží v prostředí biofilmu přežít i v proudící vodě až několik týdnů. Přítomnost patogenních bakterií v pitné vodě je pro spotřebitele zdravotním rizikem. *Escherichia coli* přežívá za uvedených podmínek podstatně kratší dobu a je citlivá k nízkým koncentracím chlóru, je proto i menší hrozbou (Lehtola, Torvinen et al. 2007).

V půdách se s biofilmy setkáme na povrchu jílovitých a zrnitých částic. Půda je heterogenní soustava. Povrch kořenů rostlin spolu s okolní půdou do 2 mm se nazývá rhizosféra. Je to oblast, kde jsou živiny dostupnější než v okolní půdě, a vědci zde prokázali přítomnost biofilmů. Růst mikroorganismů zde podporují látky uvolňované z kořenů, patří mezi ně např. exudáty aminokyselin, jednoduchých sacharidů a organických kyselin. Další vylučované látky jako jsou disacharidy, oligosacharidy, enzymy, slizovité látky a plyny (především oxid uhličitý a ethylen) mohou přitahovat bakterie ke kořenům, kde pak soutěží o místo v biofilmu (Klaban 2011).

6.6.2 Využití biofilmu v biotechnologických procesech

Uplatnění biofilmů nalezly v zařízeních pro biologickou degradaci toxických látek a čištění odpadních vod (Klaban 2011). Využití při čištění odpadních vod bylo dokázáno při čištění podzemní vody kontaminované ropou. V čistírnách odpadních vod se vícevrstevné biofilmy tvoří na filtrech, přes které voda protéká. Bakterie rozkládají organické látky, prvoci (*Protozoa*) a vířníci (*Rotatoria*) odstraňují pevné částice a patogenní mikroorganismy (Massol-Deya, Whallon et al. 1995, Klaban 2018).

Degradace toxických látek působením mikroorganismů v přírodním prostředí je příkladem jejich pozitivního využívání. Vliv mikroorganismů může být také nežádoucí, neboť dochází k ničení vlastností i vzhledu stavebních materiálů, historických památek či skal. Tyto pochody jsou označovány jako biodeteriorizace nebo také biodeteriorace. Organismu, který tento proces způsobuje, se říká biodeteriogen, pokud je mikroskopických rozměrů, potom jde o mikrobiodeteriogen. Biodeteriorace je způsobena tlakem růstové aktivity biofilmů, napomáhá jí také vlhko, ve kterém např. sinice a lišejníky zvětšují svoji velikost a rozpínají se, tím se povrchy stavebních materiálů, minerálů a hornin rozrušují (Klaban 2018).

Nitrifikační a sírné bakterie při deterioraci vytvářejí minerální kyseliny, které rozpouští křemičitany a hlinitany vápenaté na rozpustné soli. Reakce je chemicky substitucí, kdy bakterie vymění anion uhličitanový za anionty síranové nebo dusičnanové. Jiné organismy produkují organické kyseliny, které stejně jako minerální kyseliny narušují strukturu povrchu, navíc mohou narušit horniny tvorbou chelátů vlivem hydroxykyselin nebo karboxylových kyselin (de Boer, Gunnewick et al. 1991, Edwards, Bond et al. 2000).

Zásadní roli mají mikrobiální biofilmy také během nitrifikace. Biofilm v rhizosféře, tedy půdě v oblasti kořene rostliny, ovlivňuje pozitivně plodnost a růst rostliny. Biofilm může významně účinkovat v biogeochemickém cyklu síry v silně kyselém prostředí. Je nutné dodat, že rovněž biofilmy na polymerních substancích porušují jejich povrch, které vede k degradaci těchto materiálů (de Boer, Gunnewick et al. 1991, Edwards, Bond et al. 2000).

V biotechnologii našel biofilm funkci v octářství, vinařství, pivovarnictví nebo v produkci organických kyselin. Mikrobiální biofilm svou přítomností ovlivňuje organoleptické vlastnosti řady potravinářských výrobků, jako jsou některé sýry, jogurty a salámy (Klaban 2011).

Dalším výsledkem mikrobiálního působení biofilmu může být biokoroze. Železné konstrukce v půdě tak porušují sulfát-redukující bakterie. Probíhá tzv. vyluhování železa neboli grafitace. Sírné bakterie v provzdušněné půdě oxidují sulfidy až na kyselinu sírovou, jež způsobuje další korozi (Klaban 2011).

7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 *Hodnocení záznamů o nálezech na centrálních žilních katétrech*

7.1.1 Metodika a materiál

Biofilm je častou komplikací zdravotního stavu pacienta při zavedení katétru. Pracovníci Oddělení klinické mikrobiologie z Thomayerovy nemocnice v Praze rutinně testují přítomnost biofilmů na všech katétrech. Se souhlasem vedení nemocnice a pana primáře Oddělení klinické mikrobiologie Thomayerovy nemocnice v Praze, pana docenta Čermáka, jsme shromažďovali výsledky o nálezech producentů biofilmu na centrálních žilních katétrech (CŽK), které zaznamenali pracovníci místních laboratoří. Dohledávali jsme výsledky zkoušek v místním laboratorním informačním systému Envis LIMS.NET od výrobce DS Soft Olomouc s.r.o. Soustředili jsme se na přítomnost producentů biofilmu na CŽK.

Při vyhledávání jsme si nejdříve přenesli všechny záznamy o vyšetření katétrů z let 2012-2016 z databáze informačního systému používaného na oddělení do programu Microsoft Excel. Poté jsme vymazali záznamy týkající se jiných katétrů než centrálních žilních. Seřadili jsme si nálezy podle sloupce s přítomným agens.

Nejdříve jsme sečetli celkový počet zavedených katétrů, to znamená jednotlivých vyšetření pacientů. Vyřadili jsme vyšetření se stejným číslem (duplicity), což znamená, že na jednom katétru bylo nalezeno více mikroorganismů. Poté jsme vyčlenili vyšetření, kde nebyl nalezen žádný mikroorganismus a tak jsme dostali počet katétrů s nálezem patogenního mikroorganismu. Tyto tři hodnoty jsme určili v každém roce a shrnuli do **Grafů 8-1, 8-5, 8-9, 8-13, 8-17 a 8-21**.

V nemocničním systému jsme poté postupně dohledávali jednotlivé výsledky vyšetření CŽK z let 2012 až 2016. Výsledky o tvorbě biofilmu jsme si zaznamenávali k jednotlivým vyšetřením do programu Microsoft Excel. Počítačový program nemocnice umožňuje rychlé zpracování dat, výsledky tvorby biofilmů však statisticky zpracovat nedokáže vzhledem k jejich umístění mezi poznámky. Zapisovali jsme si tedy výsledky testů u jednotlivých nálezů do počítačového programu Microsoft Excel a ve stejném programu z nich poté vytvořili závěry.

Pro další vyhodnocení jsme v souboru nechali duplicitní hodnoty, ale vyřadili jsme vyšetření bez nálezu patogenu a nálezy mikroorganismů, které se vyskytovaly výjimečně a mikroby netvořící biofilm. Zůstali nám tedy nálezy běžných producentů biofilmu, které se často vyskytují na ČŽK.

V databázi jsme se zaměřili na počet napadených katétrů různými kmeny mikroorganismů, na druh patogenního mikroorganismu, jak často je tento mikrob nalezen na katétru, zda u něho byla tvorba biofilmu prokazována a schopnost nalezeného mikroorganismu tvořit biofilm na mikrotitrační destičce. Nejčastějším nálezem na katétrech jsou stafylokoky plasmakoaguláza negativní (PK-). U tohoto agens jsme se zaměřili také na pracoviště, kde byl katétr zaveden.

7.1.2 Zpracování výsledků

Výsledky vyhledávání jsme si zaznamenávali do tabulek v počítačovém programu Microsoft Excel. Výsledné hodnoty jsme získali sčítáním, přepočtem na procentuální zastoupení nebo přepočtem na počet hospitalizací. Následně jsme k nim v tomtéž programu vytvořili grafy pro lepší představu problematiky.

7.2 Stanovení účinku xanthohumolu na biofilm

7.2.1 Materiál

Cílem našeho experimentu bylo ověřit a prokázat tvorbu biofilmu různých druhů bakterií a zjištění účinku XTH na bakterie a jejich biofilm. Kromě určení minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) XTH na planktonické bakterie jsme zjišťovali schopnost průniku XTH do biofilmu, která by se projevila inhibicí uvolňování planktonických bakterií z biofilmu, což se nám ukáže jako nezakalená jamka mikrotitrační destičky. Poslední částí experimentu byla zkouška, zda XTH dokáže bakterie uvnitř biofilmu usmrtit.

7.2.1.1 Testovací mikroorganismy

Testovací kmeny mikroorganismů byly získány ze vzorků z katétrů pacientů z Thomayerovy nemocnice v Praze, převážně se jednalo o katétrů močové. Kmeny byly uchovávány v lednici při 8 °C. Poté byly nově přeočkovány. Pracovali jsme s kmeny *Staphylococcus aureus* MRSA, *Staphylococcus aureus* 869, *Enterococcus faecalis* 890 a *Enterococcus faecalis* 881. Číselný údaj za názvem mikroba pochází ze seznamu Sbír-

ky kmenů Thomayerovy nemocnice v Praze. Úvodní zkoušky jsme praktikovali ještě s dalšími kmeny bakterií. Pro každý pokus byly použity kmeny kultivované na krevním Columbia agaru inkubované 24 hodin v termostatu při 37 °C.

7.2.1.2 Testovaná látka

Experiment jsme provedli s XTH, který nám dodal Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s. Praha. Testovaný XTH byl izolován z chmele z loňské sklizně, tedy z podzimu 2016. Tento žlutý prášek měl koncentraci 80 % XTH. XTH jsme nejdříve rozpustili v dimethylsulfoxidu a poté smíchali s BHI s 0,5 % glukózy. Výsledný roztok XTH měl koncentraci 512 µg/ml. Takto připravený roztok jsme uchovávali zmrazený ve zkumavkách při -20 °C a před každým pokusem jsme potřebné množství rozmrazili. Všechny experimenty jsme provedli do 10 dnů od zamrazení XTH.

7.2.1.3 Další materiál

Pomůcky: mikrotitrační destičky GAMA group a.s. České Budějovice, jednorázové kličky velikosti 1 a 10 µl, kovové kličky s otočným, automatická pipeta a špičky, zkumavky

Přístroje: termostát, chladnička, mraznička, elektrická třepačka na zkumavku, třepačka na mikrotitrační destičky

Chemikálie: krevní agar Columbia agar BIO-RAD laboratories. Inc., Francie s příměsí beraní krve od LMS – Lab Medic Servis, s.r.o. Jaroměř, brain heart infusion (BHI) od společnosti OXOID LTD United Kingdom, krystalová violeť Dr. Kulich Pharma s.r.o., dimethylsulfoxid, destilovaná voda

7.2.2 Pracovní postup

7.2.2.1 Průkaz tvorby biofilmu různých bakterií

K práci jsme použili mikrobiální suspenzi mikroba v BHI s 0,5 % glukózy. Kolonie byla vždy přenesena pomocí kovové kličky do zkumavky s BHI a řádně rozmíchána na elektrické třepačce. Bakteriální suspenzi jsme pipetovali po 100 µl do jamek mikrotitrační destičky. Po dvaceti čtyř hodinové inkubaci v termostatu při teplotě 37 °C jsme suspenzi z jamek vylili, opatrně jsme jamky vypláchli destilovanou vodou a biofilm ulpělý v jamce jsme barvili krystalovou violetí. Barvivo jsme vylili, destičku opláchli destilovanou vodou a nechali uschnout.

7.2.2.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace, minimální mikrobi- cidní koncentrace a sledování potlačení růstu biofilmu

Pro následující část práce jsme na mikrotitrační destičku do čtyř sloupců pipetovali 100 μ l bakteriální suspenze. Poté jsme pipetovali do jamek XTH za použití dvojkového ředění, takže jsme dosáhli koncentrací 512-4 μ g/ml. Jeden sloupec jsme nechali bez XTH pro pozitivní kontrolu růstu mikroorganismů. Po 24 hodinové inkubaci jsme okem sledovali zákal či sediment a zapisovali, od které koncentrace je růst mikroba inhibován. První jamka s nejnižší koncentrací XTH, kde byl růst potlačen (nebyl zákal nebo sediment) jsme určili jako MIC. Jamky od MIC a další s vyšší koncentrací XTH jsme vyočkovali na krevní agar pro určení MBC. Poté jsme destičku opatrně vylili, vypláchli destilovanou vodou a barvili krystalovou violetí. Pozorovali jsme, od které koncentrace XTH byla potlačena tvorba biofilmu.

7.2.2.3 Sledování potlačení uvolňování bakterií z biofilmu a schopnost průniku xanthohumolu do biofilmu

Do dalších mikrotitračních destiček jsme pipetovali 50 μ l bakteriální suspenze. Na jedné destičce byl vždy jeden druh mikroba, aby při vylévání suspenze nedošlo ke kontaminaci jiným kmenem. Po inkubaci 24 hodin jsme jamky vylili, vypláchli destilovanou vodou a přidali XTH pomocí dvojkového ředění. Po další inkubaci jsme sledovali zákal, který vytvořily uvolňované bakterie z biofilmu. Odebrali jsme kličkou vzorky z jamek, naředili v BHI a vyočkovali na plotny s krevním agarem kličkou na koncentraci o 10^4 menší, aby byl výsledek počitatelný. Opět vypláchnuté destičky po předcházejícím procesu jsme doplnili pouze o 100 μ l BHI a nechali inkubovat do druhého dne. Poté jsme opět sledovali zákal a tím zjišťovali, zda se XTH dostal do biofilmu a inhiboval či usmrtil mikroby uvnitř biofilmu a tím potlačil i uvolňování planktonických mikroorganismů do BHI. Nakonec jsme biofilm mechanicky rozrušili a jamky vyočkovali na krevní agar. Tak jsme zjistili, zda byly mikroby uvnitř biofilmu usmrceny či jen potlačen jejich růst a uvolňování.

7.2.3 Zpracování výsledků

U každé zkoušky a u každého testovacího mikroorganismu jsme provedli 4 až 7 opakování měření a pozitivní kontrolu. Z naměřených výsledků jsme vypočítali aritmetický průměr a ten zaznamenali do tabulek nebo grafů.

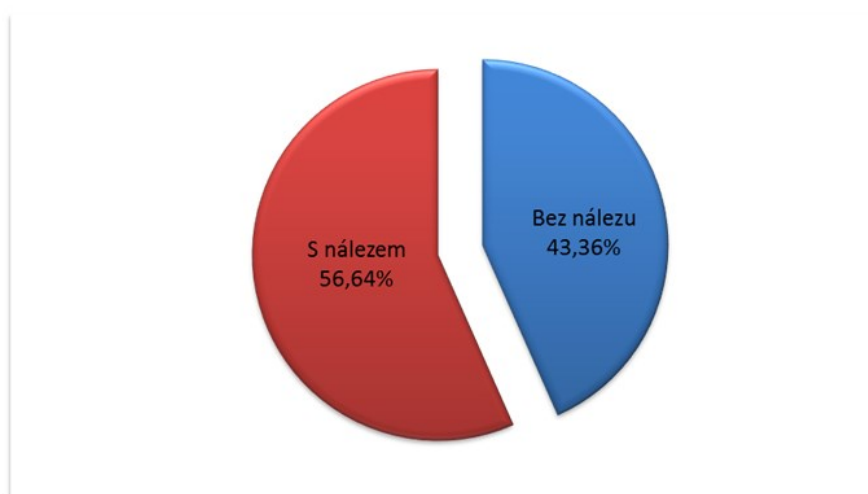
8 VÝSLEDKY

8.1 Vyhodnocení vyšetření producentů biofilmu na centrálních žilních katétrech

Rok 2012

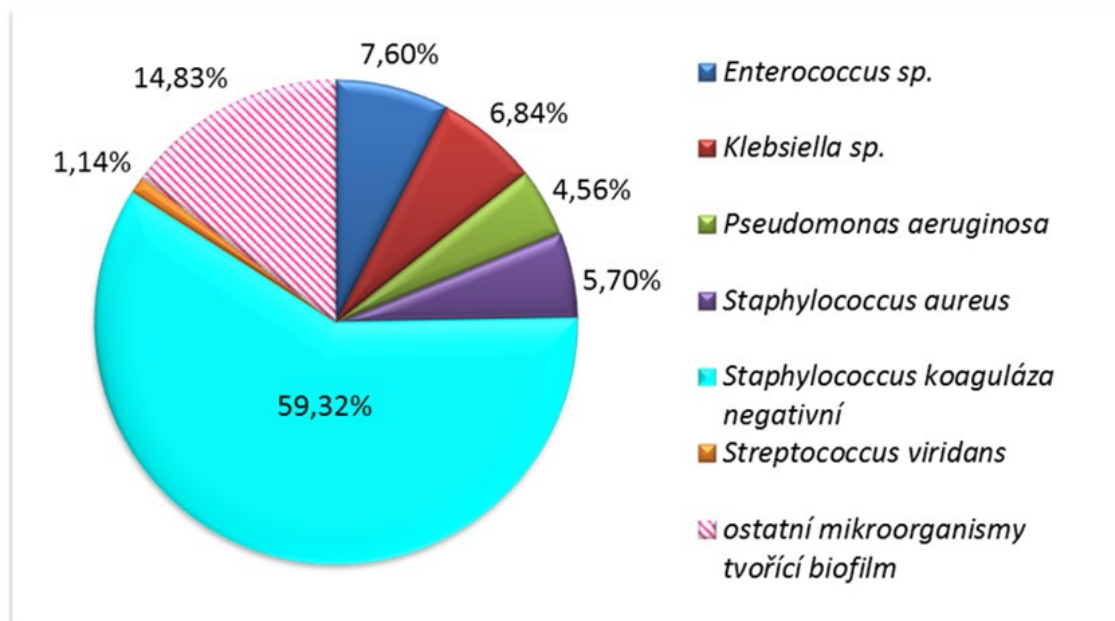
V roce 2012 v laboratoři vyšetřili 209 vzorků s nálezem patogenního mikroorganismu, což je více než polovina z celkových 369 vzorků. Rozložení znázorňuje **Graf 8-1**.

Graf 8-1 Katétry s mikrobiálním nálezem a bez nálezu v roce 2012, n=369



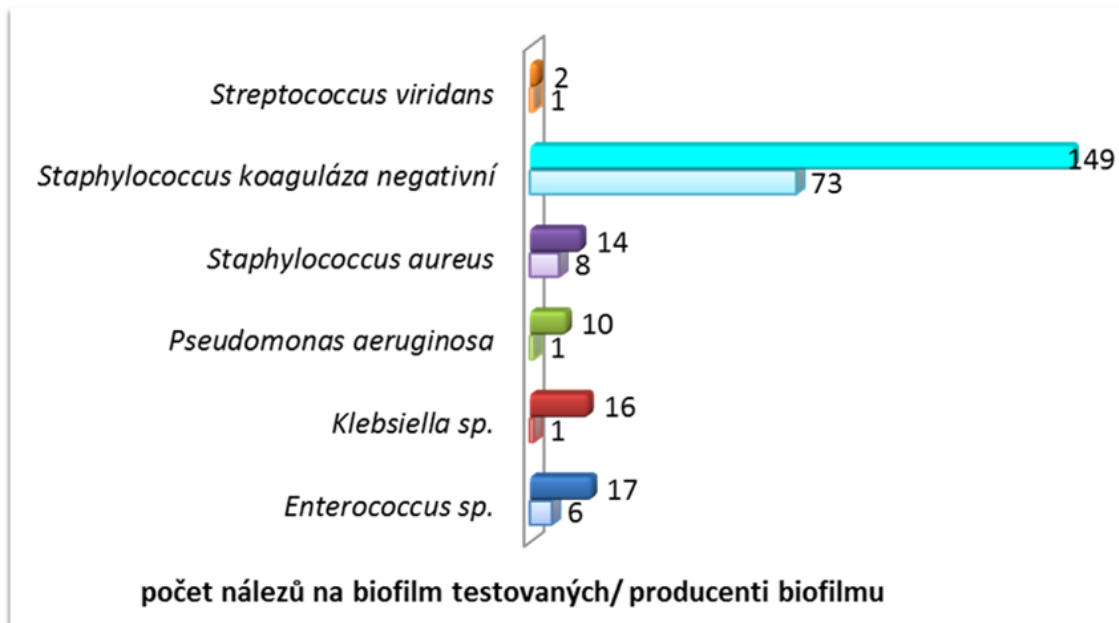
Následující výsledky nálezů na CŽK se týkají běžných producentů biofilmu. **Graf 8-2** shrnuje zastoupení producentů biofilmu na CŽK v roce 2012. Největší zastoupení měl *Staphylococcus* PK-, následovaly ho druhy *Enterococcus* sp., *Klebsiella* sp. a *Staphylococcus aureus*. Tyto kmeny měly největší zastoupení během sledovaných let. Rok 2012, co se zastoupení jednotlivých druhů mikrobů týče, se projevuje největší rozmanitostí dalších druhů mikroorganismů tvořících biofilm. Skupina dalších druhů kromě sledovaných nejčastějších tvoří téměř 15 % a je představována sedmi druhy mikrobů. Patří mezi ně *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Candida tropicalis*, *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, gramnegativní tyčinka nefermentující a *Morganella morganii*.

Graf 8-2 Procentuální zastoupení druhů mikroorganismů v roce 2012, n=263



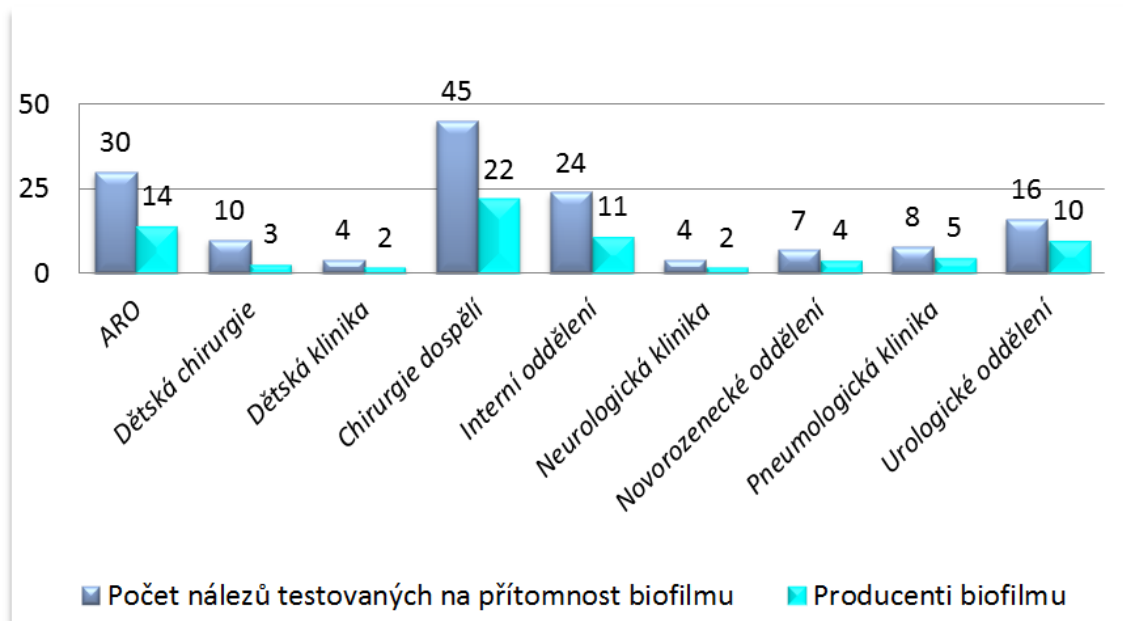
Tvorbu biofilmu jsme vyhodnocovali vůči nálezům na biofilm testovaným. Určitý počet nálezů totiž testován na přítomnost biofilmu nebyl. Nejčastější producent biofilmu na CŽK v roce 2012 byl *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* PK- a *Streptococcus viridans*. *Str. viridans* působí jako častý producent, výsledek je však silně ovlivněn počtem zkoumaných nálezů. Přibližně polovina stafylokoků PK- z celkového počtu 149 vytvářela biofilm na CŽK. Přes 50 % nálezů druhu *Staphylococcus aureus* bylo spojeno s tvorbou biofilmu. *Pseudomonas aeruginosa* se neprojevil jako významný producent biofilmu. Nejméně pozitivních nálezů ze sledovaných mikrobů na zkoušku na biofilm bylo spojeno s rodem *Klebsiella*. Výsledky znázorňuje **Graf 8-3**.

Graf 8-3 Počty katétrů s nálezem mikroba a jeho schopnost tvořit biofilm v roce 2012



Nejvíce nálezů stafylokoků PK- bylo z oddělení chirurgie dospělých. Biofilm byl přítomen přibližně u poloviny pozitivních nálezů na všech odděleních. Jednotlivé počty ukazuje **Graf 8-4**.

Graf 8-4 Nálezy *Staphylococcus* PK- podle oddělení v roce 2012



Rok 2013

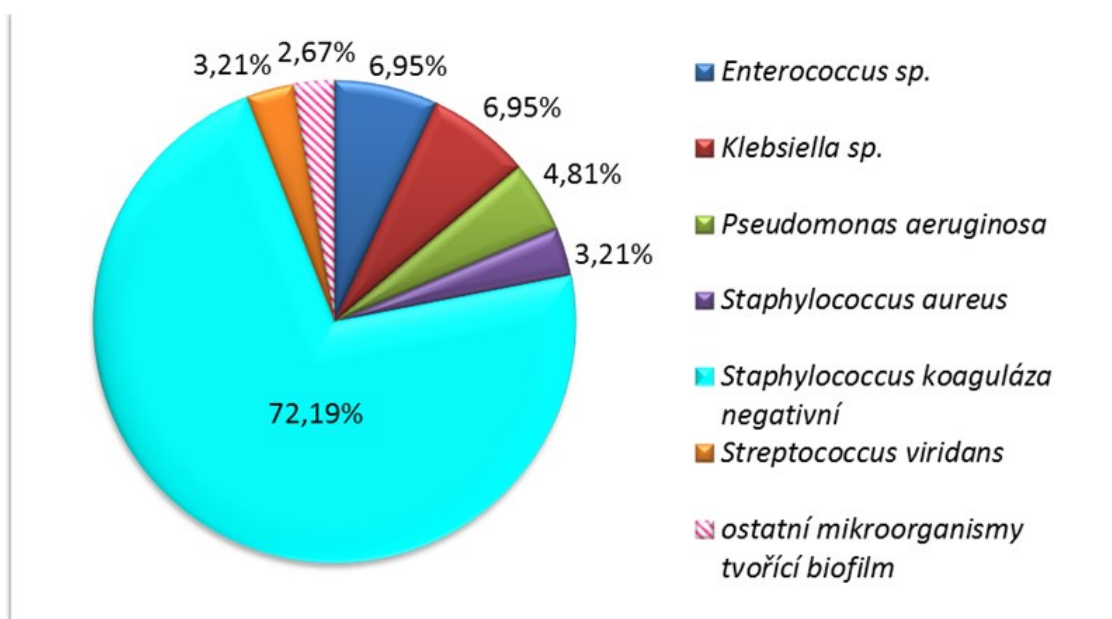
V roce 2013 mírně klesá procento pozitivních nálezů, jak znázorňuje **Graf 8-5**. Klesl i celkový počet zavedených katétrů na 314. Bez nálezů patogenního mikroorganismu bylo určeno 141 katétrů.

Graf 8-5 Počet katétrů s mikrobiálním nálezem a bez nálezů v roce 2013, n=314



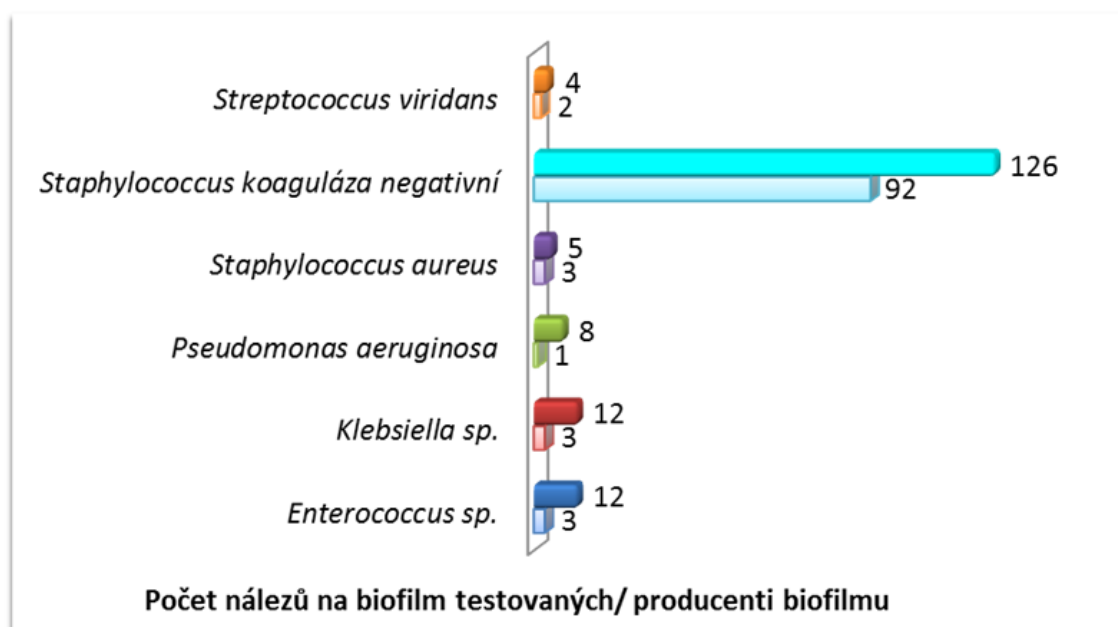
Zastoupení hlavních druhů mikrobů zůstává podobné, liší se však nálezy méně početných kmenů, jak ukazuje **Graf 8-6**. V roce 2013 máme pouze 5 katétrů s nálezem biofilmu těchto mikrobů a tvoří je 2 druhy bakterií, konkrétně *Acinetobacter sp.* a *Moraxella sp.*

Graf 8-6 Procentuální zastoupení druhů mikroorganismů v roce 2013, n=187



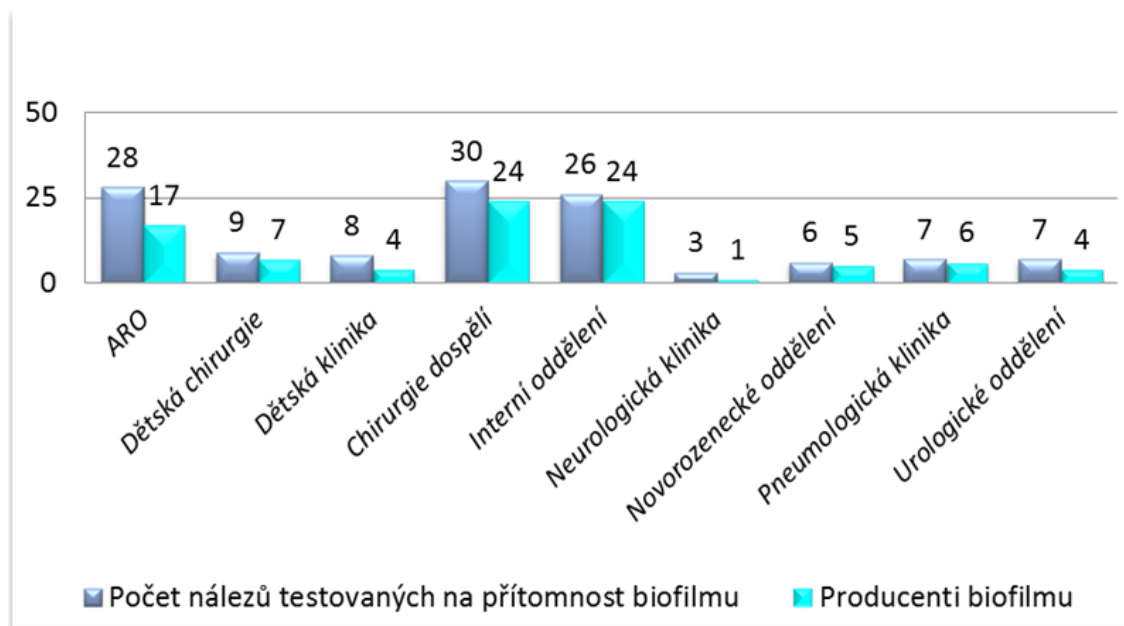
Největší zastoupení mezi nálezy mají v roce 2013 opět stafylokoky PK-. Bylo shledáno výrazně méně nálezů druhu *Staphylococcus aureus*. Stafylokoky jsou celkově nejčastějšími producenty biofilmu. Téměř 75 % stafylokoků PK- vytváří biofilm. U druhu *S. aureus* byla tvorba biofilmu ověřena u více než poloviny nálezů. Počet nálezů bakterie *Streptococcus viridans* dvojnásobně stoupl oproti roku 2012 a producenti biofilmu stále tvoří 50 % nálezů. Nejméně častým producentem biofilmu se v tomto roce jeví *Pseudomonas aeruginosa*. Všechny počty shrnuje **Graf 8-7**.

Graf 8-7 Počty katétrů s nálezem určitého mikroba a jeho schopnost tvořit biofilm v roce 2013



Jako v předchozím roce, i zde máme nejvíce katétrů s nálezem S. PK- z oddělení ARO, chirurgie a interna. Rozdílem je, že na oddělení chirurgie a interny téměř všechny nálezy patogenu vykazují také pozitivní nález biofilmu, jak ukazuje **Graf 8-8**. V předchozím roce byl biofilm vytvořen přibližně na polovině napadených katétrů. Nejnížší počet nálezů opět zaznamenali na neurologické klinice.

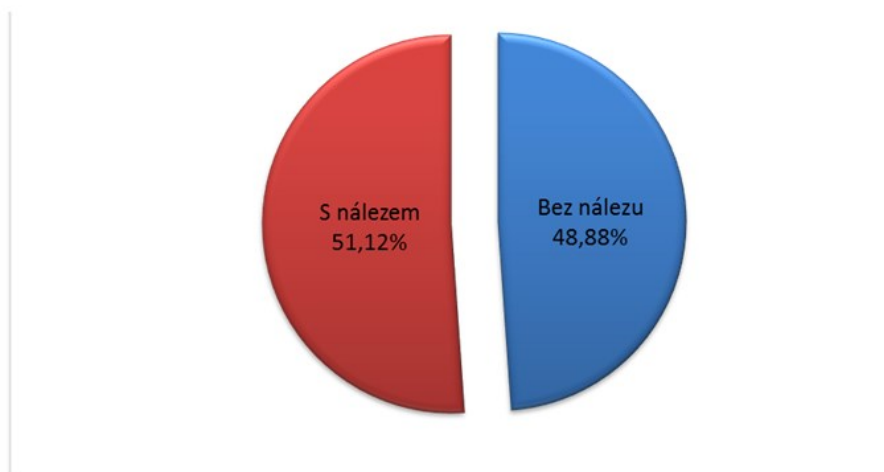
Graf 8-8 Nález Staphylococcus PK- podle oddělení v roce 2013



Rok 2014

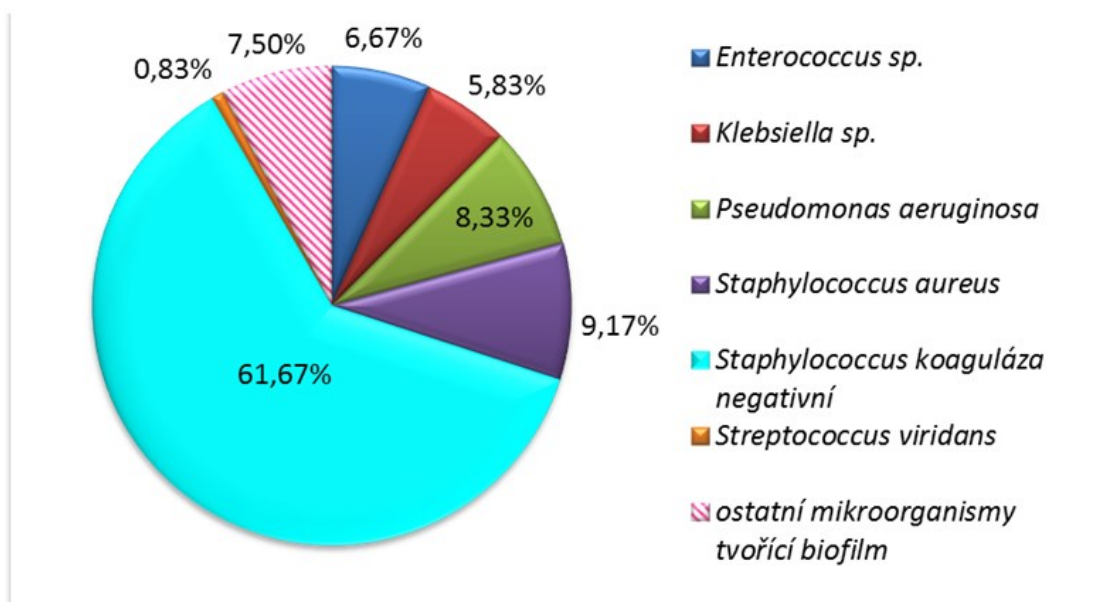
Počet katétrů ve sledovaném roce 2014 výrazně poklesl, a z celkových 223 je 114 nálezů pozitivních na přítomnost patogenního mikroorganismu (viz **Graf 8-9**).

Graf 8-9 Počet katétrů s mikrobiálním nálezem a bez nálezů v roce 2014, n=223



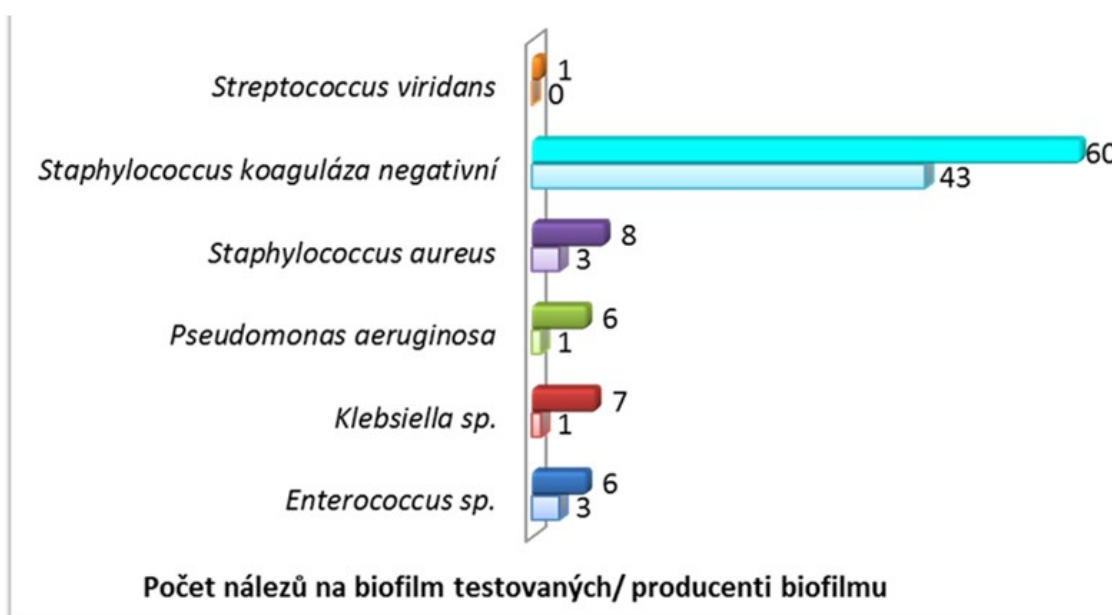
Počet nálezů jednotlivých patogenů poklesl, častěji se objevuje *Staphylococcus aureus* a méně zastoupené mikroorganismy tvořící biofilm viz **Graf 8-10**. Mezi kmeny s méně častým zastoupením se vyskytuje *Candida tropicalis* a *Corynebacterium sp.*

Graf 8-10 Procentuální zastoupení druhů mikroorganismů v roce 2014, n=120



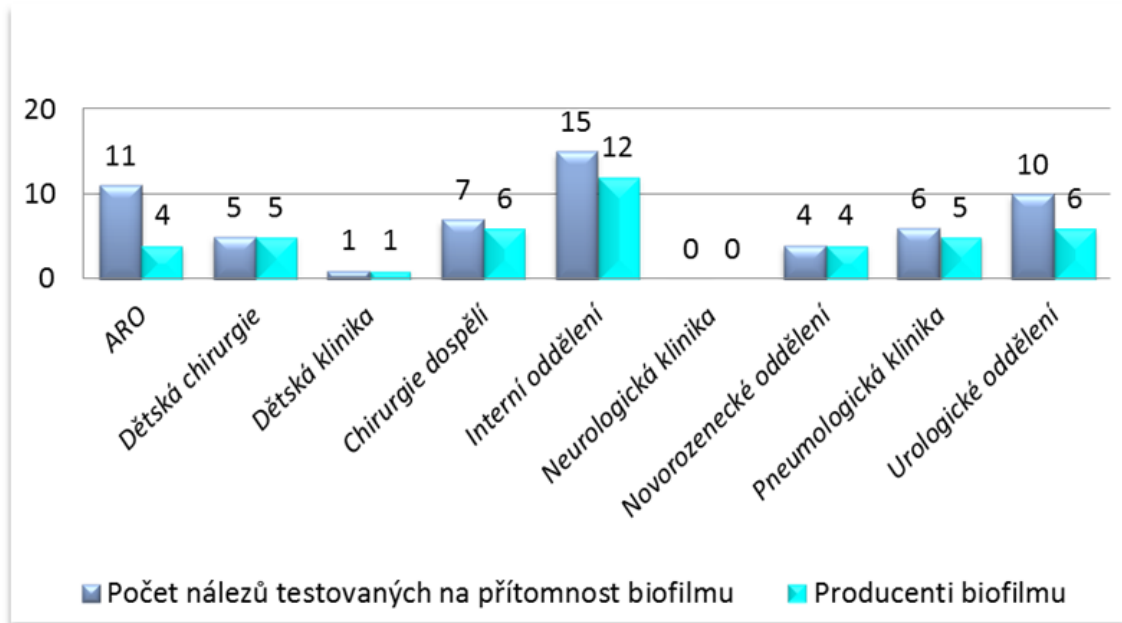
V roce 2014 byl vyšetřen jeden nález druhu *Streptococcus viridans*. Testování na přítomnost biofilmu u tohoto nálezu bylo negativní. V tvorbě biofilmu mezi nejsilnější producenty stále patří stafylokoky, významně biofilm vytvářejí také enterokoky. Počty nálezů ukazuje **Graf 8-11**.

Graf 8-11 Počty katétrů s nálezem určitého mikroba a jeho schopnost tvořit biofilm v roce 2014



Nejvíce producentů biofilmu z kmene *Staphylococcus* PK- pochází z interního oddělení. Na **Grafu 8-12** je vidět vysoká schopnost stafylokoků PK- tvořit biofilm na různých odděleních. Poprvé jsme objevili oddělení, kde se s nálezem biofilmu produkovaným kmenem S. PK- za celý rok nesetkali, a to je neurologická klinika.

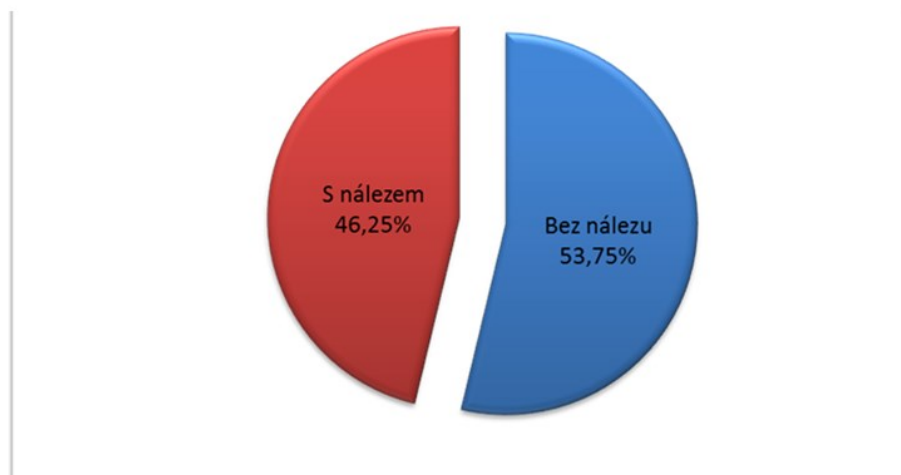
Graf 8-12 Nálezy *Staphylococcus* PK- podle oddělení v roce 2014



Rok 2015

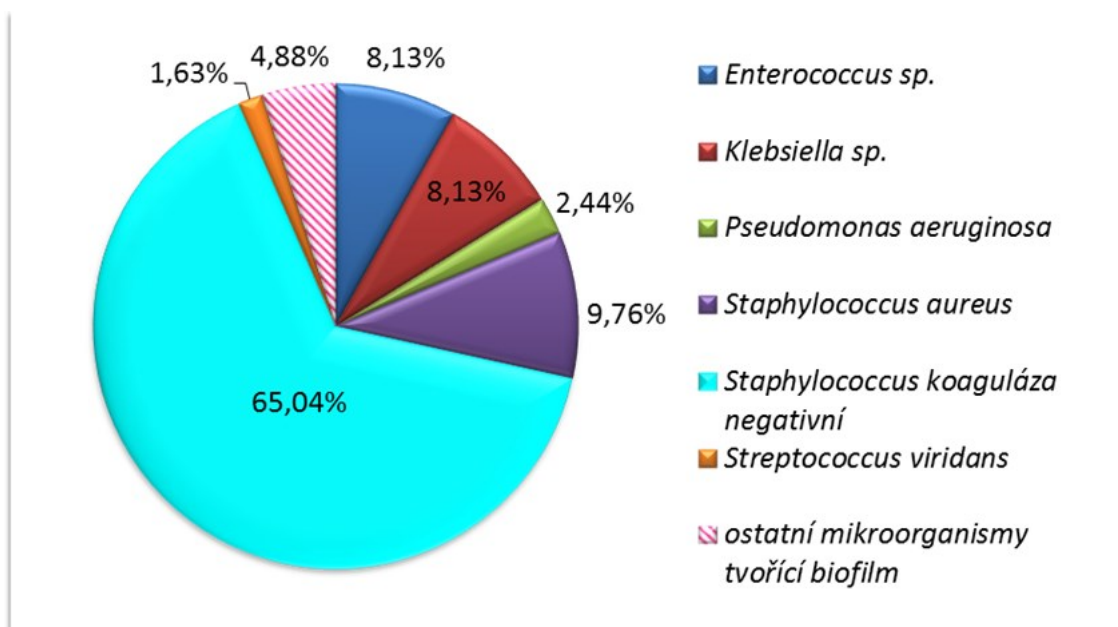
V roce 2015 se procento pozitivních nálezů dostalo pod 50 %, jak ukazuje **Graf 8-13**. Počet zavedených CŽK je vyšší než v předchozím roce, ale z celkových 253 katétrů bylo infikováno pouze 117 katétrů.

Graf 8-13 Počet katétrů s mikrobiálním nálezem a bez nálezu v roce 2015, n= 253



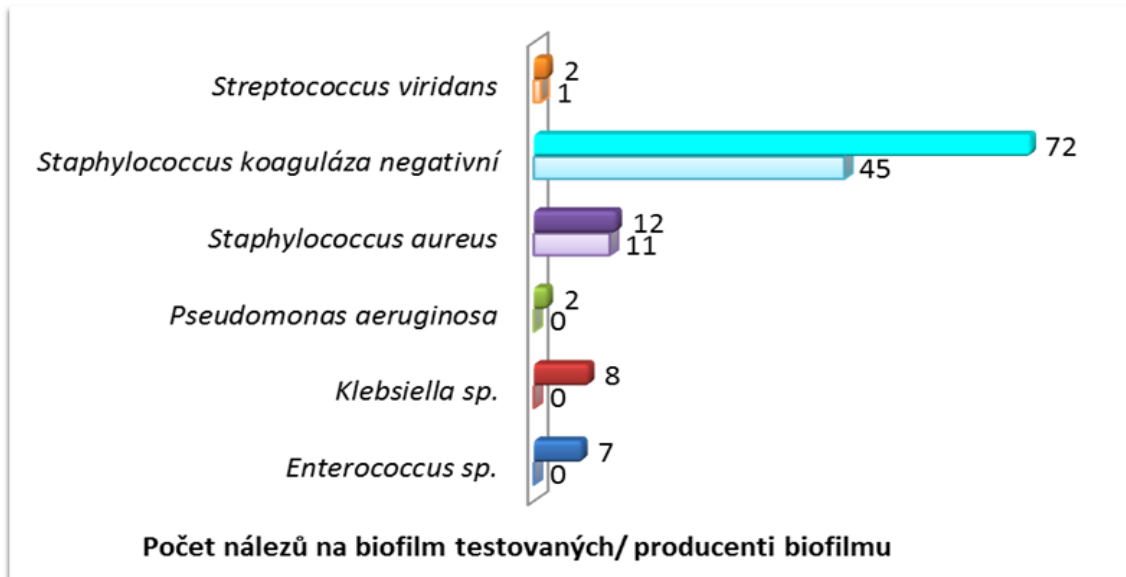
Zastoupení producentů biofilmu ukazuje **Graf 8-14**. Mezi málo početnými kmeny tvořící biofilm se objevuje druh *Corynebacterium sp.* Zastoupení ostatních kmenů se liší, výrazně méně se vyskytuje např. druh *Pseudomonas aeruginosa*.

Graf 8-14 Procentuální zastoupení druhů mikroorganismů v roce 2015, n=123



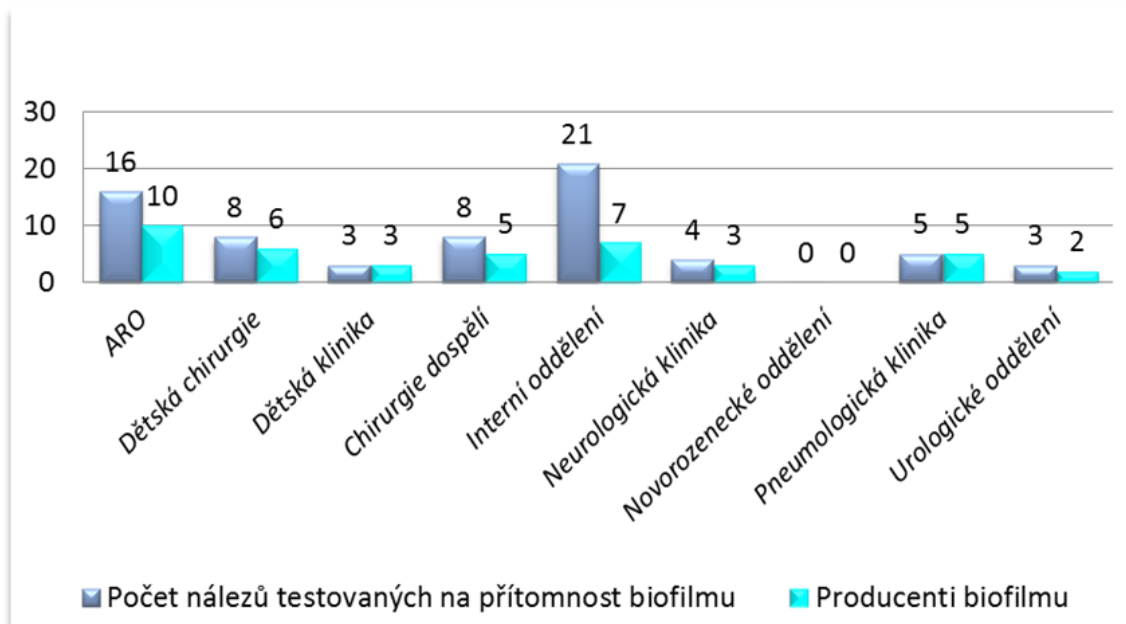
V roce 2015 počet nálezů druhu *Staphylococcus aureus* vzrostl a stejně tak množství biofilmů, které vytvořily zlaté stafylokoky nalezené na ČŽK. Téměř všechny nálezy *S. aureus* byly schopny formovat biofilm. Tvorbou biofilmu se projevili pouze stafylokoky, častí producenti biofilmu. *Streptococcus viridans* formoval biofilm u jednoho nálezu ze dvou testovaných. Další mikroorganismy osídlující ČŽK, které jsme během pěti let sledovali, v roce 2015 nevytvářely biofilm, jak znázorňuje **Graf 8-15**. Počet nálezů *Pseudomonas aeruginosa* byl výrazně nižší než v předchozím roce.

Graf 8-15 Počty katétrů s nálezem určitého mikroba a jeho schopnost tvořit biofilm v roce 2015



Bez nálezů biofilmu S. PK- se ukazuje novorozenecké oddělení. Na **Grafu 8-16** je vidět méně častá tvorba biofilmu stafylokoků. Producenti biofilmu z interního oddělení tvoří pouze třetinu ze všech nálezů na tomto oddělení. Na dalších odděleních je produkce biofilmu stále poměrně vysoká k celkovému počtu nálezů.

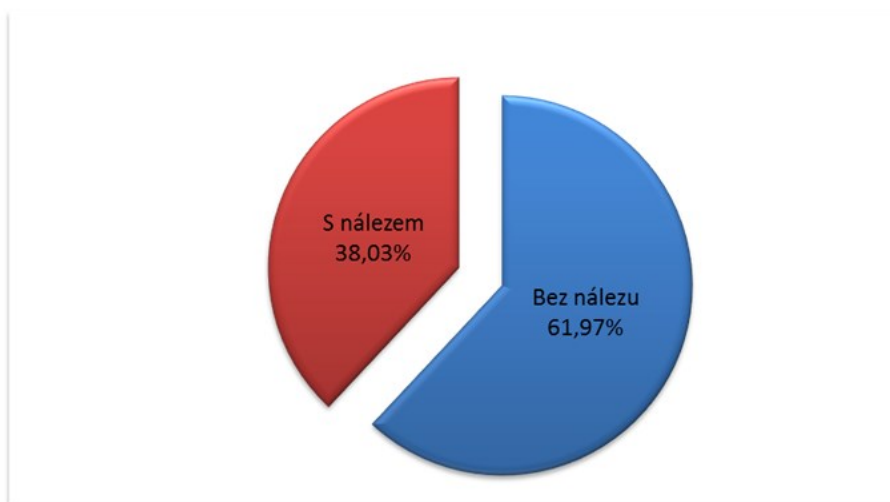
Graf 8-16 Nálezy *Staphylococcus PK-* podle oddělení v roce 2015



Rok 2016

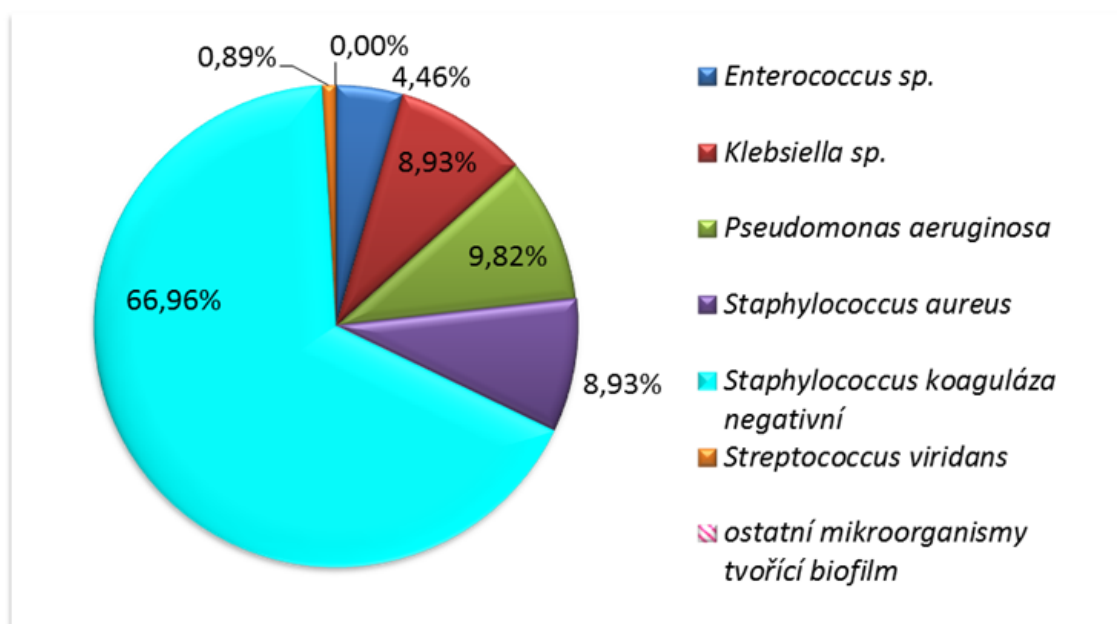
Ačkoli v roce 2016 počet vyšetřených ČŽK stoupl na 305, u procenta pozitivních nálezů sledujeme stále klesající trend. Shledali jsme pouze 116 katétrů s nálezem mikroorganismu. **Graf 8-17** vyjadřuje zastoupení v procentech.

Graf 8-17 Počet katétrů s mikrobiálním nálezem a bez nálezu v roce 2016, n=305



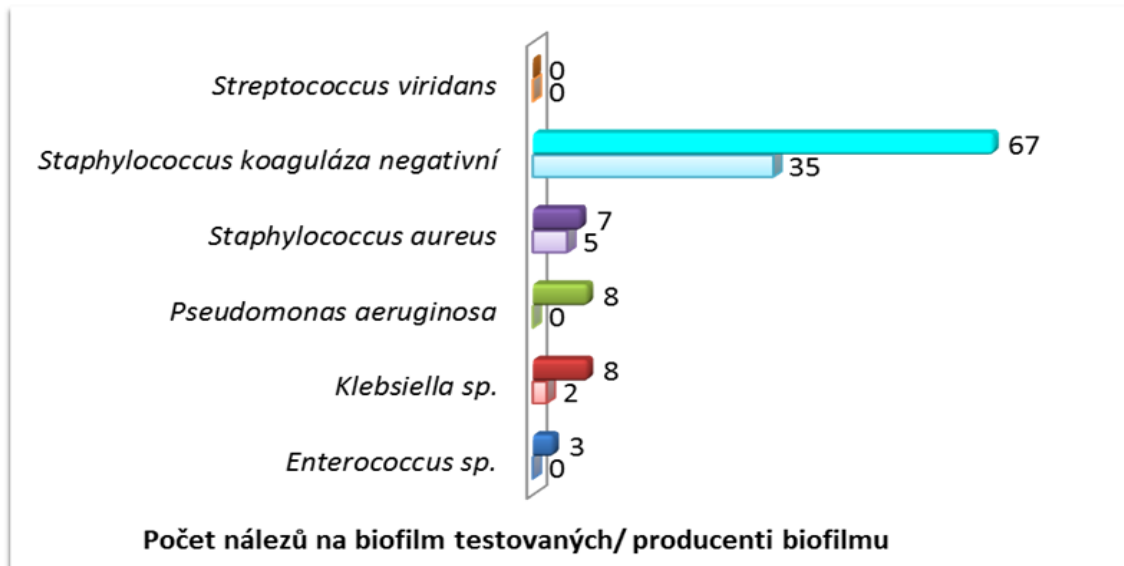
Méně početně zastoupené druhy tvořící biofilm se v roce 2016 již nevyskytují, jak prezentuje **Graf 8-18**. Nesetkáváme se ani s bakterií *Streptococcus viridans*. Odolnost zřejmě získává druh *Pseudomonas aeruginosa*.

Graf 8-18 Procentuální zastoupení druhů mikroorganismů v roce 2016, n=112



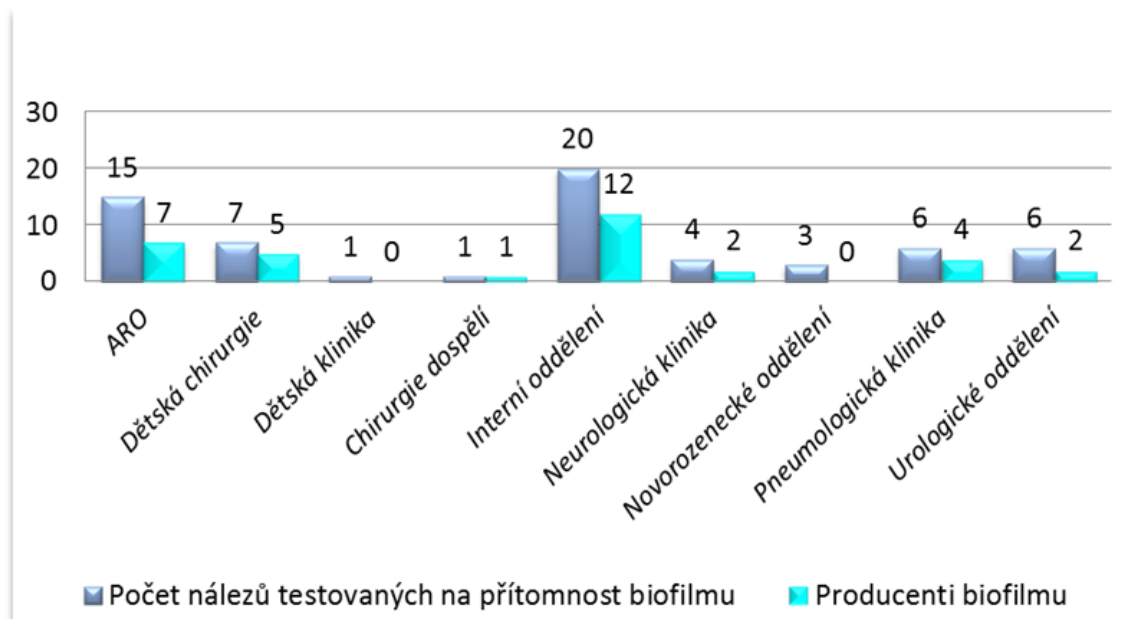
V roce 2016 netvořily enterokoky ani *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. Jako častý producent se opět prezentuje *S. aureus* a *S. PK-*. Téměř 75 % nálezů *S. aureus* bylo spojeno také s vytvořením biofilmu. Počty ukazuje **Graf 8-19**.

Graf 8-19 Počty katétrů s nálezem určitého mikroba a jeho schopnost tvořit biofilm v roce 2016



V posledním sledovaném roce 2016 se dvě oddělení nesetkala s biofilmem *S. PK-* na katétrech, a to dětská klinika a novorozenecké oddělení, jak ukazuje **Graf 8-20**.

Graf 8-20 Nálezy *Staphylococcus PK-* podle oddělení v roce 2016



Shrnutí dat ze všech sledovaných let

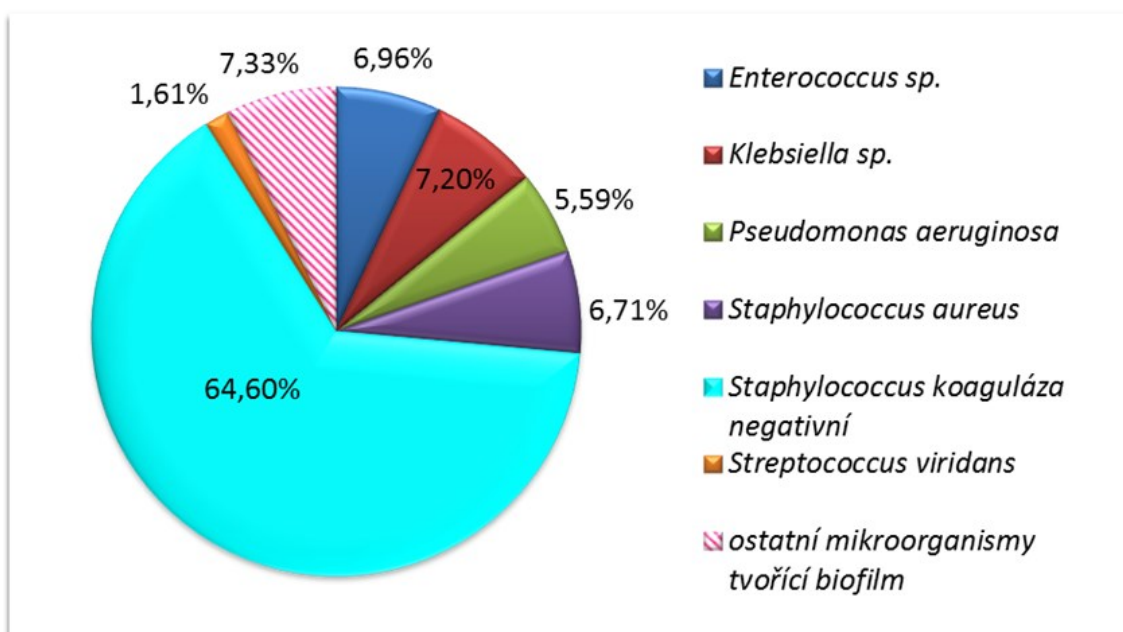
Za sledovaných pět let bylo vyšetřeno 1464 CŽK. Pracovníci oddělení klinické mikrobiologie shledali na 729 katétrech, tedy na 49,80 % CŽK, nález patogenního mikroorganismu. Druhá polovina katétrů byla bez nálezu patogenu, jak ukazuje **Graf 8-21**.

Graf 8-21 Počet katétrů s mikrobiálním nálezem a bez v letech 2012 – 2016, n=1464



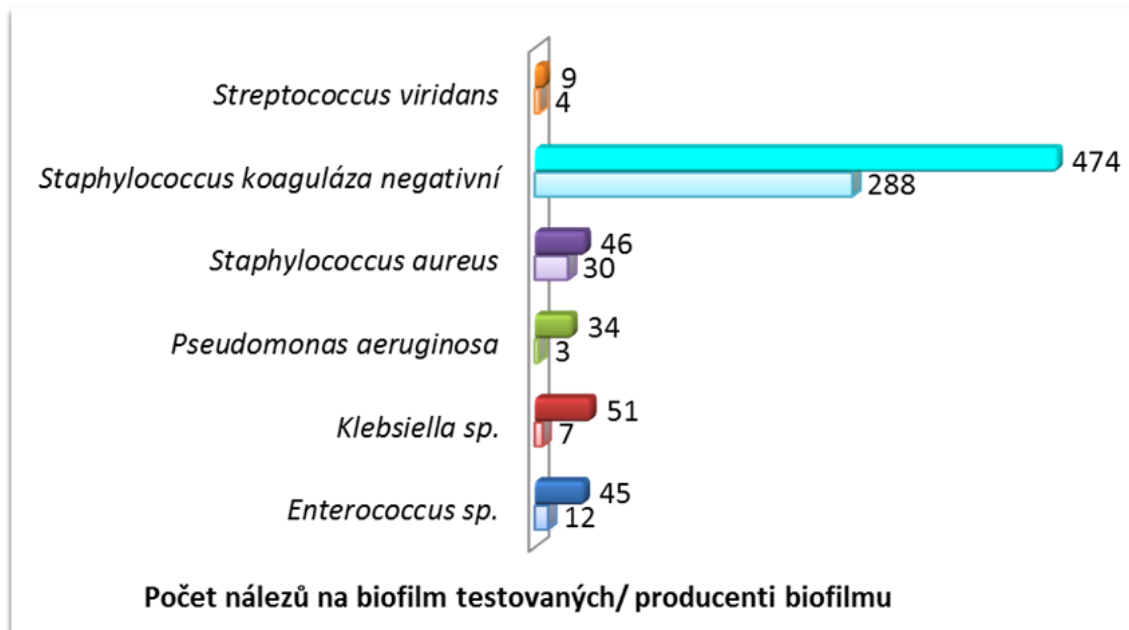
Nejvíce nálezů na katétrech během pěti let tvoří producenti biofilmu z rodu *Staphylococcus*. Zastoupení sledovaných druhů bakterií prezentuje **Graf 8-22**.

Graf 8-22 Procentuální zastoupení druhů mikroorganismů v letech 2012 - 2016, n=805



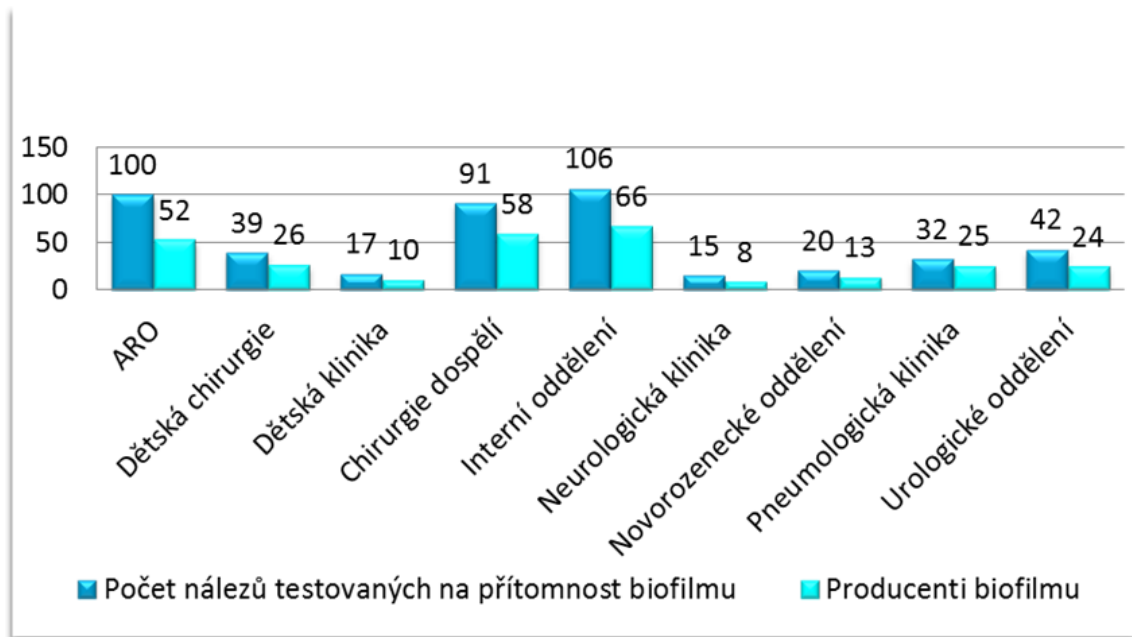
Graf 8-23 demonstruje celkové sečtení nejčastějších producentů biofilmu a jejich aktuální tvorbu biofilmu. Jako nejčastější producent biofilmu ze sledovaných druhů se jeví *Staphylococcus aureus*. U 65 % jeho nálezů byla zaznamenána také tvorba biofilmu. Enterokoky, druh *Pseudomonas aeruginosa* a *Klebsiella sp.* patří mezi méně časté producenty biofilmu.

Graf 8-23 Počty katétrů s nálezem určitého mikroba a jeho tvorba biofilmu v letech 2012-2016



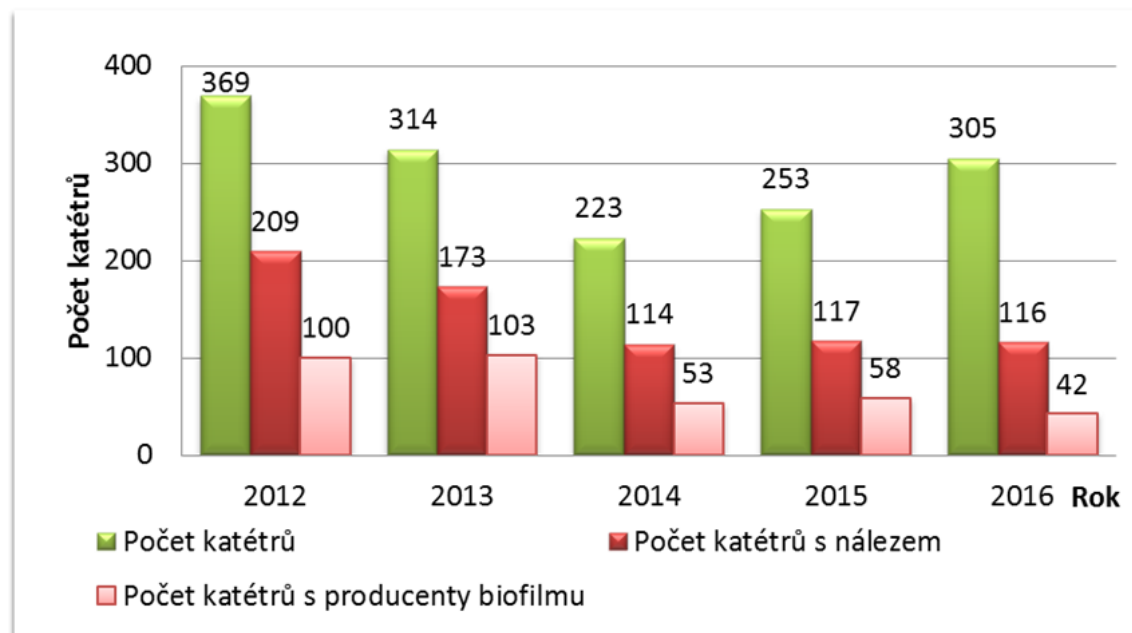
Nejvíce vzorků s nálezem S. PK- pocházelo z interního oddělení, chirurgie a ARA. 62 % nalezených stafylokoků na interním oddělení formovalo biofilm. Nálezy S. PK- ze všech oddělení jsou spojeny s častou produkcí biofilmu. Nálezy S. PK- podle oddělení prezentuje **Graf 8-24**.

Graf 8-24 Nález Staphylococcus PK- podle oddělení v letech 2012 – 2016



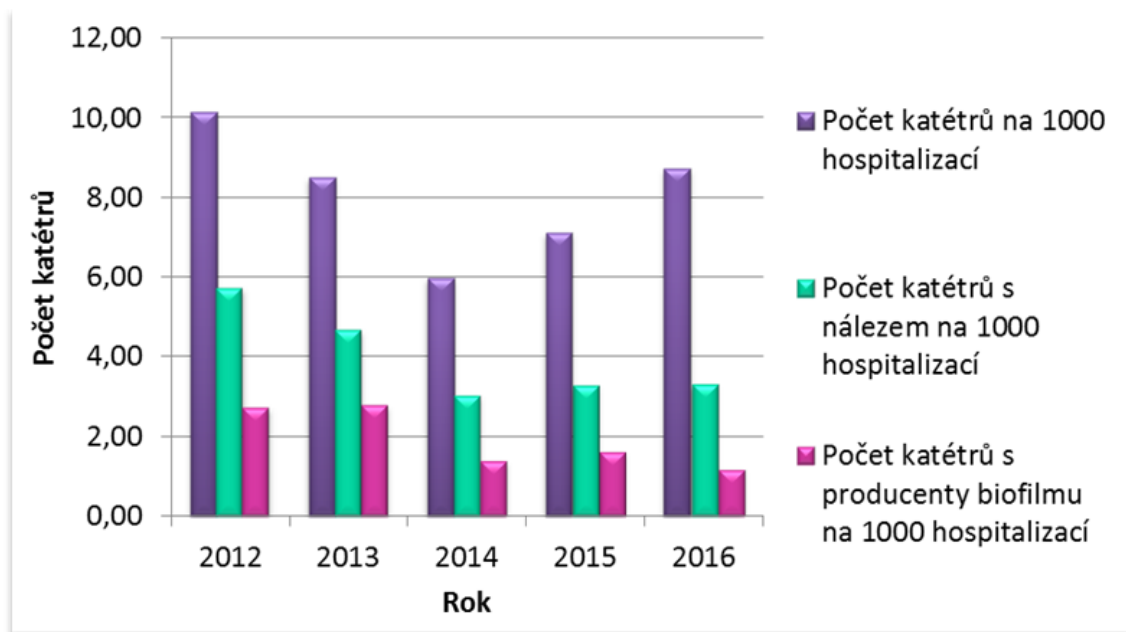
Během stanovených pěti let pozorujeme pokles katétrů s nálezem patogenního mikroorganismu (**Graf 8-25**). Během let ubývá také schopnost mikroorganismů tvořit biofilm, což je patrné z následujících grafů.

Graf 8-25 Vývoj počtu katétrů, katétrů s nálezem patogenního mikroorganismu a katétrů s producenty biofilmu od roku 2012 do roku 2016



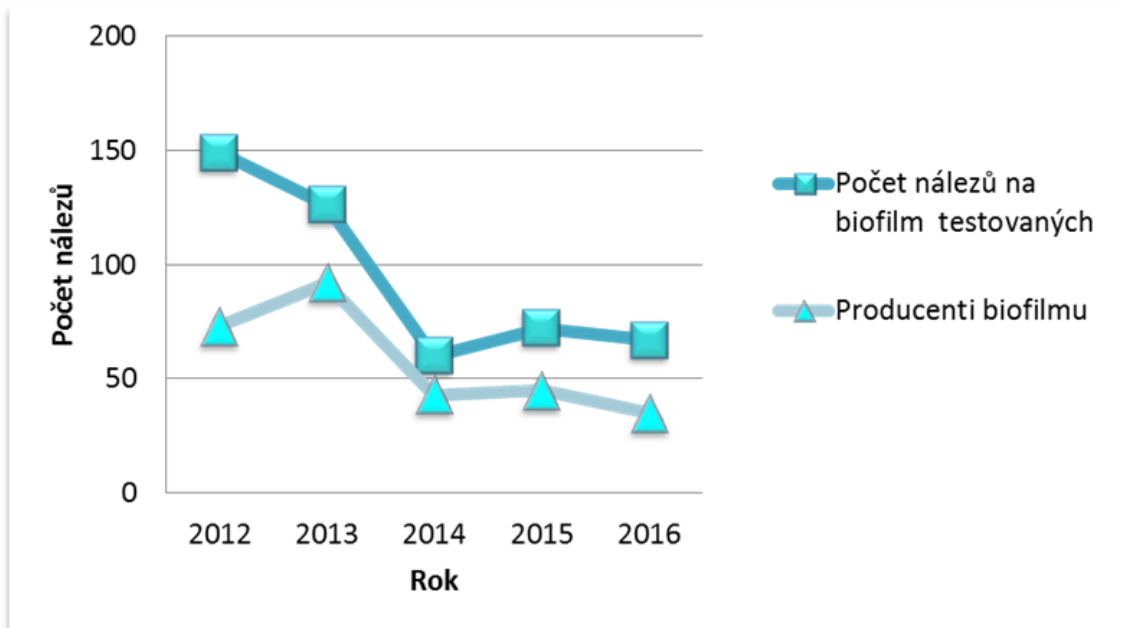
Přepočet počtu katétrů na počet hospitalizací ukazuje kvalitu péče v Thomayerově nemocnici. Během sledovaných let 2012 až 2016 bylo v nemocnici zaznamenáno průměrně 36 167 hospitalizací ročně. Nejméně hospitalizací bylo zaznamenáno v roce 2016 s počtem 34 883. Nejvíce hospitalizací (37 281) bylo započítáno v roce 2014. Přepočet nálezů na katétrech na 1000 hospitalizací ukazuje klesající trend počtu infekcí i počtu producentů biofilmu na katétrech. Počet katétrů s producenty biofilmu poklesl o více než polovinu, z 2,75 na 1,20 na 1000 hospitalizací. Vývoj znázorňuje **Graf 8-26**.

Graf 8-26 Vývoj počtu katétrů, katétrů s mikrobiálním nálezem a katétrů s producenty biofilmu přepočítáno na 1000 hospitalizací v letech 2012-2016



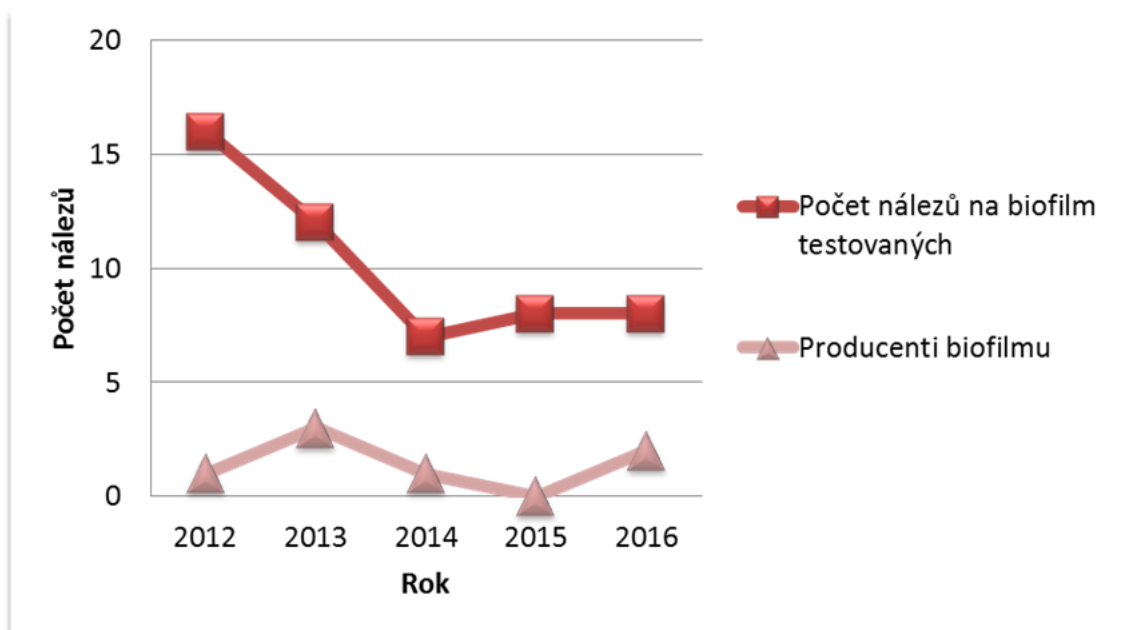
Od roku 2012 do roku 2016 klesá počet nálezů *S. PK-*. Stejně tak sledujeme klesající trend produkce biofilmu. Pouze rok 2012 vybočuje a vykazuje nejnižší sledované hodnoty u druhu *S. PK-*. Hodnoty podává **Graf 8-27**.

Graf 8-27 Sledování výskytu nálezu *Staphylococcus PK*- v letech 2012-2016



Výskyt nálezů na katétrech rodu *Klebsiella* má klesající trend. Zástupci rodu *Klebsiella* jsou producenty biofilmu, ale biofilm tvoří méně často. Počty nálezů v letech 2012 až 2016 shrnuje **Graf 8-28**.

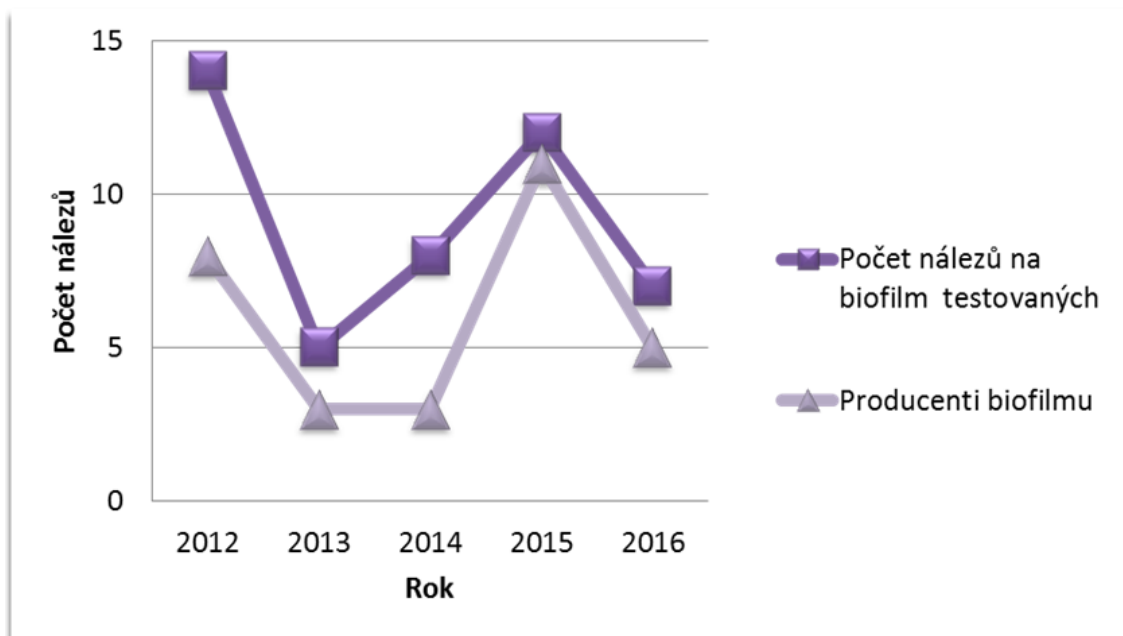
Graf 8-28 Sledování výskytu nálezu *Klebsiella sp.* v letech 2012-2016



Druh *Staphylococcus aureus* je významným nálezem na katétrech a častým producentem biofilmu. Během sledovaných let dosahuje produkce biofilmu *S. aureus*

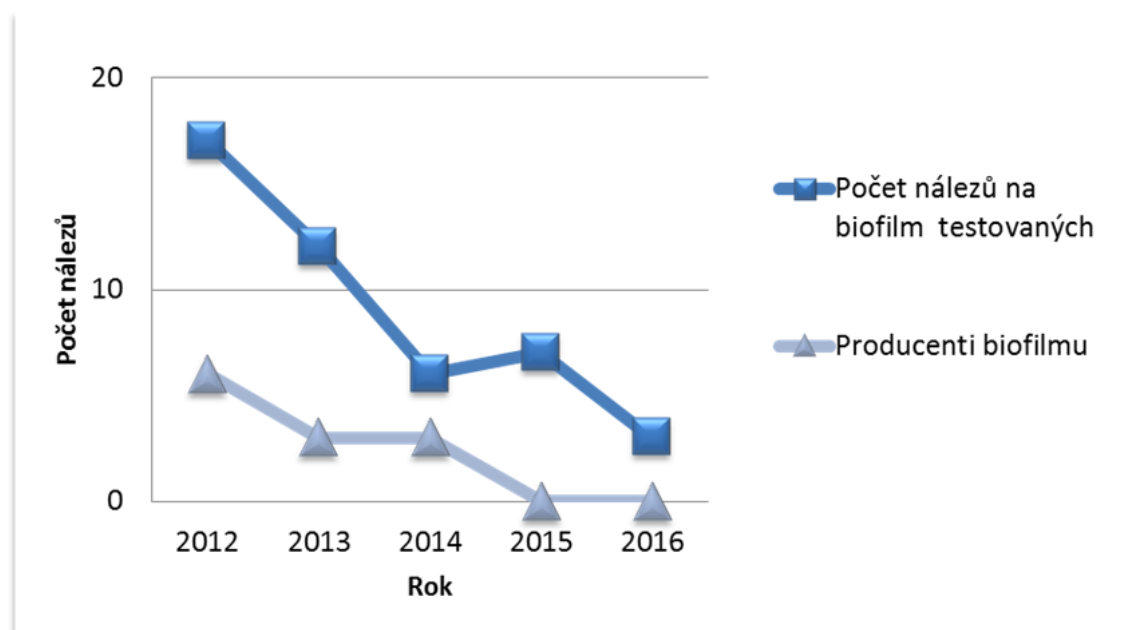
vysokých hodnot. Tvorba biofilmu tohoto mikroba na ČŽK vykazuje stoupající trend, jak ukazuje **Graf 8-29**.

Graf 8-29 Sledování výskytu nálezu *Staphylococcus aureus* v letech 2012-2016



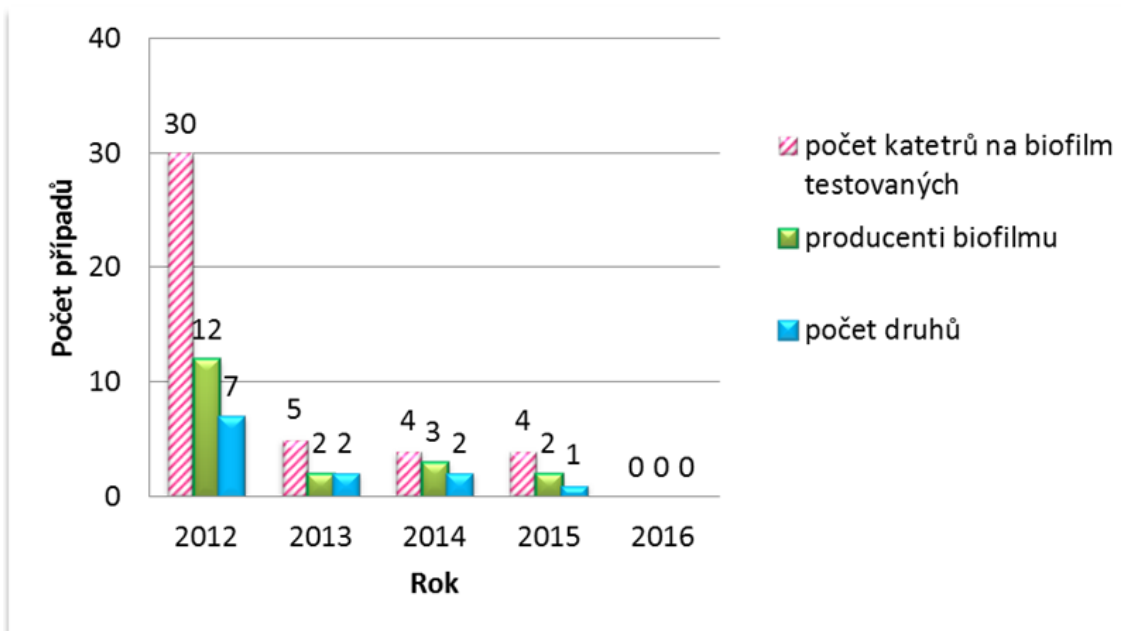
Výskyt enterokoků na ČŽK klesá stejně jako jejich sledovaná produkce biofilmu. V posledních dvou sledovaných letech nebyl vyšetřen biofilm bakterie rodu *Enterococcus* na ČŽK. Počty nálezů ukazuje **Graf 8-30**.

Graf 8-30 Sledování výskytu nálezu *Enterococcus* sp. v letech 2012-2016



Méně početné skupiny mikroorganismů, které tvoří biofilm, jsme shromáždili do jedné skupiny. Všechny sledované hodnoty vykazující pravidelný klesající trend. Procentuální vyjádření tvorby biofilmu sledované skupiny kolísá. Celkové počty jsou nízké a vyjádření neposkytuje spolehlivou závislost. **Graf 8-31** prezentuje významnou klesající různorodost patogenních mikroorganismů na ČŽK.

Graf 8-31 Sledování výskytu nálezu ostatních mikroorganismů tvořících biofilm v letech 2012-2016

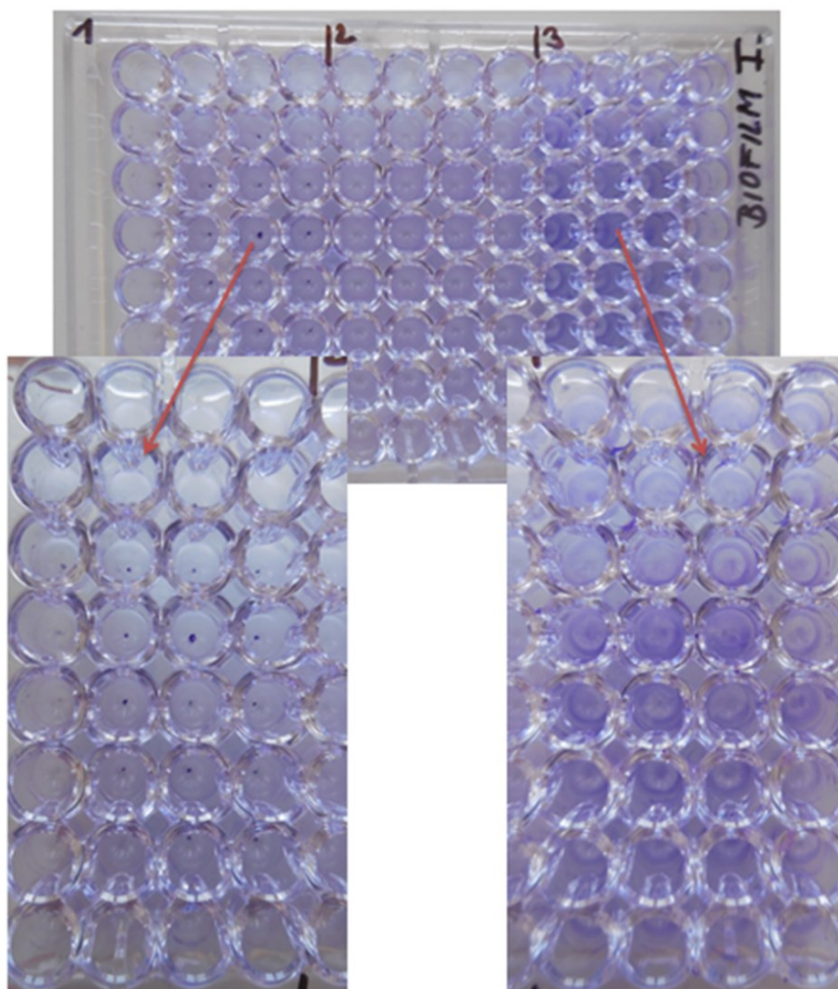


8.2 Účinky xanthohumolu na biofilm

8.2.1 Průkaz tvorby biofilmu různých bakterií

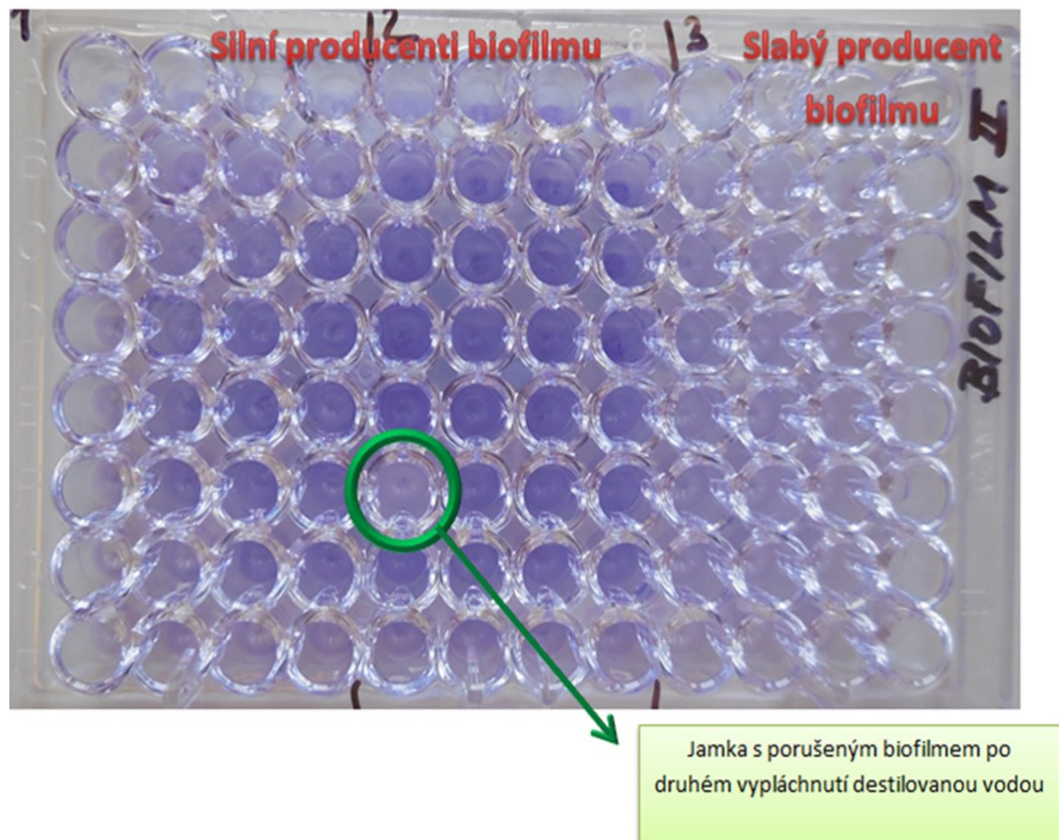
Prvním pokusem jsme ověřili, že námi zvolené mikroby jsou producenty biofilmu. Po inkubaci mikrobiální suspence v BHI, která trvala 24 hodin, jsme destičku opatrně vypláchli a barvili krystalovou violetí. Biofilm zůstal fialově zbarvený. Na **Obrázcích 8-1, 8-2 a 8-3** je vidět zřetelný rozdíl mezi silnými a slabými producenty biofilmu. Jako silný producent se jeví *Staphylococcus aureus* 869 a *Enterococcus faecalis* 890 a *E. faecalis* 124. Odlišnou stavbou biofilmu jsem se zabývala již v teoretické části, zde na fotografii je zachycen zjevný rozdíl viditelný pouhým okem. Zatímco jeden druh testovaného mikroorganismu tvoří biofilm se sedimentem na dně jamky, druhý vytváří souvislou vrstvu podél stěn jamky a poslední zesílenou vrstvu.

Obrázek 8-1 Detail biofilmu druhů *Staphylococcus koaguláza negativní* 829/11+enterokoky-*Staphylococcus koaguláza negativní*+*Proteus*-*Staphylococcus aureus* 869

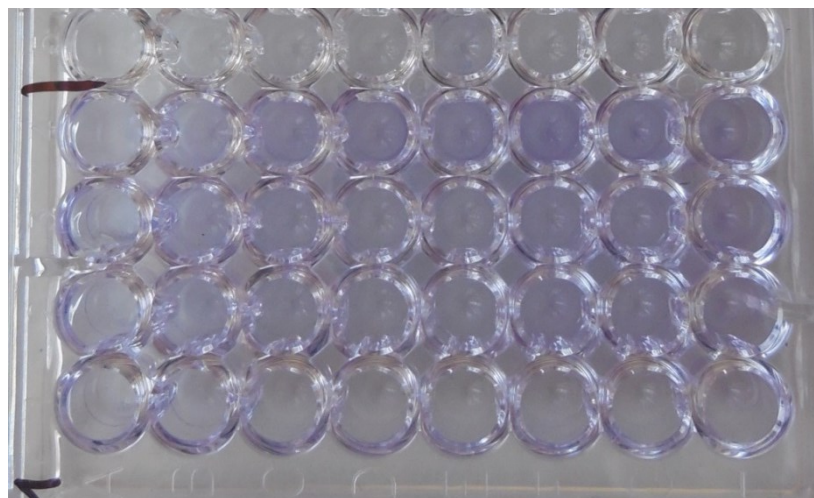


Při vymývání jamek jsme se zaměřili na pevnost a stálost biofilmu. Biofilm lze snadno mechanicky rozrušit. Po druhém vypláchnutí destilovanou vodou se biofilm z jamky vymyl, jak je vidět na **Obrázku 8-2**.

Obrázek 8-2 Detail biofilmu druhů *Enterococcus faecalis* 890-*Enterococcus faecalis* 124-*Enterococcus faecalis* 881



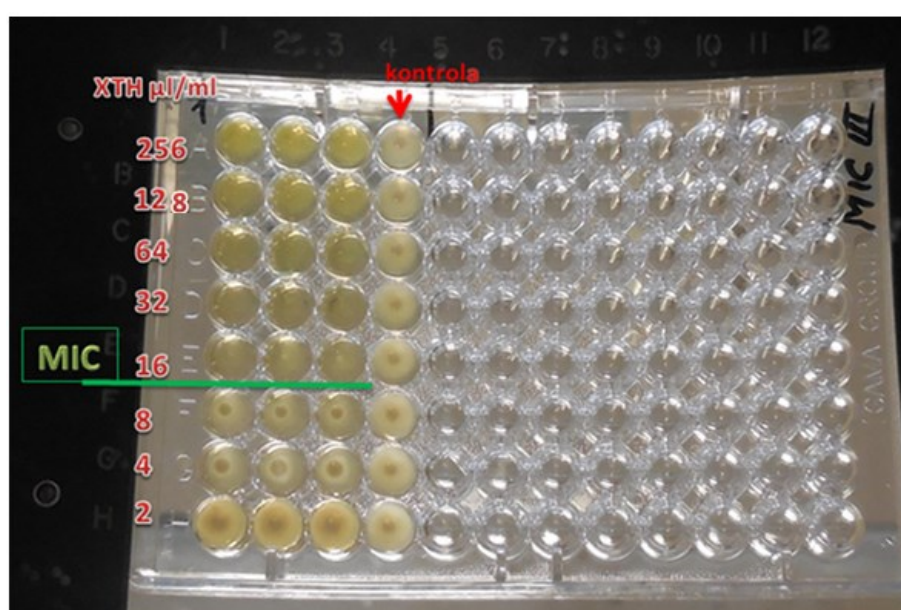
Obrázek 8-3 Biofilm druhu *Staphylococcus aureus* MRSA



8.2.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace, minimální baktericidní koncentrace a sledování potlačení růstu biofilmu

Výsledné hodnoty koncentrace XTH potřebné k inhibici růstu či usmrcení sledovaných planktonických mikroorganismů jsou shrnuty v následující **Tabulce 8-1**. Stálé nízké koncentrace XTH postačovaly k ovlivnění druhu *Staphylococcus aureus* MRSA. MBC enterokoků byla vyšší než námi zkoušená koncentrace. Stafylokoky zkoušená koncentrace XTH usmrtila, u enterokoků však pouze inhibovala růst. Na **Obrázku 8-4** je vidět výsledky této části experimentu a vizuální odečítání hodnot MIC.

Obrázek 8-4 MIC xanthohumolu na kmen bakterie *Staphylococcus aureus* MRSA



Tabulka 8-1 Průměrné hodnoty MIC a MBC získané experimentem

Druh mikroorganismu	MIC [$\mu\text{g/ml}$]	MBC [$\mu\text{g/ml}$]
<i>Staphylococcus aureus</i> 869	74,67	213,33
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	16,00	85,30
<i>Enterococcus faecalis</i> 890	128,00	>256,00
<i>Enterococcus faecalis</i> 881	13,30	>256,00

Sledování potlačení tvorby biofilmu barvením podalo jen orientační výsledky. Výsledek byl silně ovlivněn vymytím destičky.

8.2.3 Sledování potlačení uvolňování bakterií z biofilmu a schopnost průniku xanthohumolu do biofilmu

8.2.3.1 Potlačení uvolňování planktonických bakterií z biofilmu

Průměrná koncentrace XTH, potřebná k potlačení uvolňování planktonických bakterií z biofilmu, byla vyšší, než koncentrace inhibující volné bakterie. Nejnižší koncentrace XTH ovlivňuje druh *Staphylococcus aureus* 869, k inhibici ostatních druhů je potřeba vyšší koncentrace účinné látky. Hodnoty shrnuje **Tabulka 8-2**.

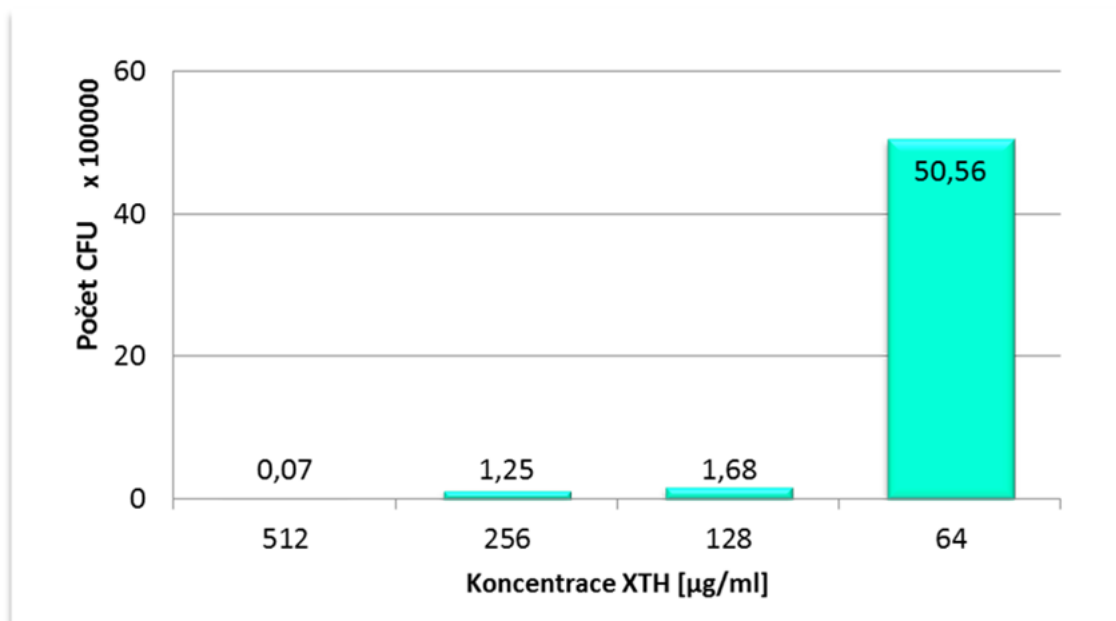
Tabulka 8-2 Průměrné koncentrace inhibující uvolňování bakterií z biofilmu

Druh mikroorganismu	Průměrná Inhibiční koncentrace [μg/ml]
<i>Staphylococcus aureus</i> 869	188,20
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	240,00
<i>Enterococcus faecalis</i> 890	256,00
<i>Enterococcus faecalis</i> 881	256,00

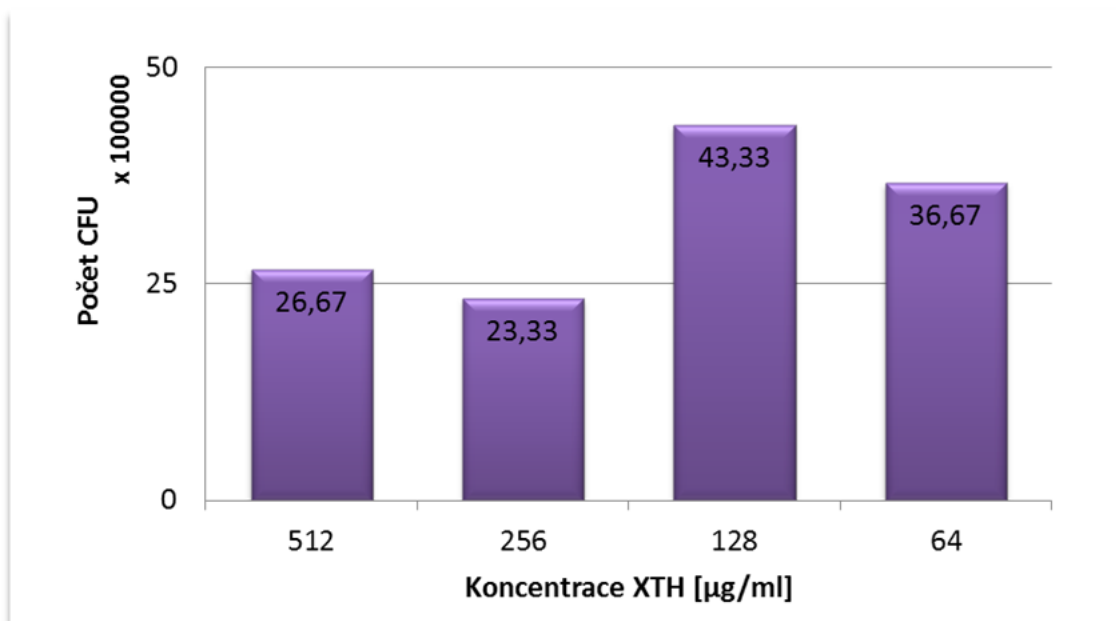
8.2.3.2 Potlačení uvolňování planktonických bakterií z biofilmu kvantitativně

Po kvantitativním vyočkování jamek mikrotitrační destičky na krevní agar jsme sledovali počty uvolněných kolonií z biofilmu. Se stoupající koncentrací XTH klesal počet CFU *Staphylococcus aureus* 869. Při koncentraci 512 μg/ml bylo u většiny měření uvolňování kolonií této bakterie zcela potlačeno, jak je vidět na **Grafu 8-32**.

Graf 8-32 Průměrný počet CFU po vyočkování na krevní agar *S. aureus* 869



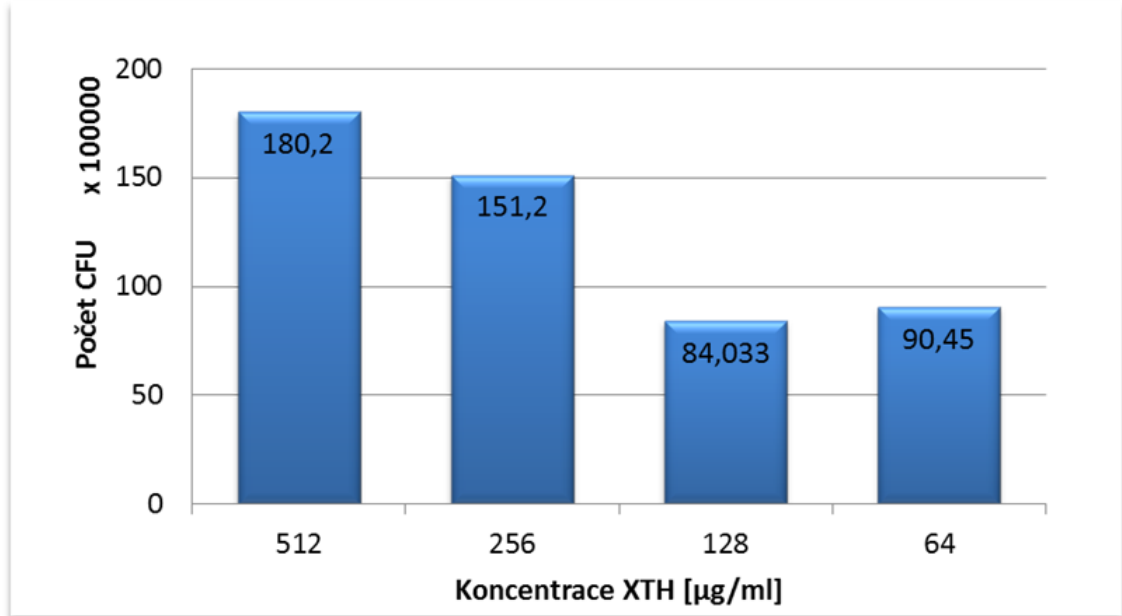
Graf 8-33 Průměrný počet CFU po vyočkování na krevní agar *S. aureus* MRSA



Staphylococcus aureus MRSA vykazuje také přímou závislost inhibice počtu kolonií na vzrůstající koncentraci XTH, jak ukazuje **Graf 8-33**. Potlačené uvolňování bakterií však není tak silné jako u předchozího druhu.

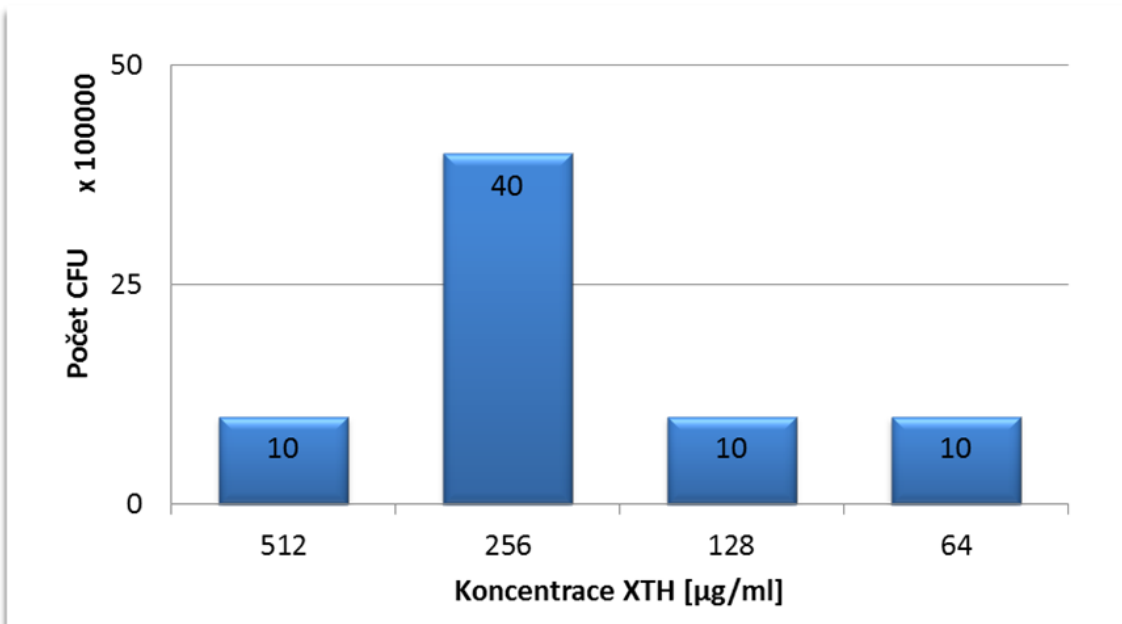
Enterokoky se chovají nepředvídatelně a se stoupající koncentrací XTH neklesá počet kolonií, počet dokonce stoupá (**Graf 8-34**).

Graf 8-34 Průměrný počet CFU po vyočkování na krevní agar *E. faecalis* 881



Počet kolonií obou druhů rodu *Enterococcus* není úměrný použité koncentraci XTH, jak prezentuje i **Graf 8-35**.

Graf 8-35 Průměrný počet CFU po vyočkování na krevní agar *E. faecalis* 890



8.2.3.3 Koncentrace XTH pronikající do biofilmu a tím potlačující další uvolňování planktonických bakterií z biofilmu

Průměrná koncentrace XTH pronikající do biofilmu je shrnuta v **Tabulce 8-3**. Nejnižší průměrné hodnoty vykazuje *Enterococcus faecalis* 890.

Tabulka 8-3 Průměrné koncentrace pronikající do biofilmu a tak bránící uvolňování planktonických bakterií

Druh mikroorganismu	Průměrné koncentrace pronikající do biofilmu [$\mu\text{g/ml}$]
<i>Staphylococcus aureus</i> 869	224,00
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	213,33
<i>Enterococcus faecalis</i> 890	146,29
<i>Enterococcus faecalis</i> 881	204,80

Po rozrušení biofilmu a vyočkování na krevní agar ve všech případech přežívají testované mikroby ve všech koncentracích.

9 DISKUSE

9.1 Vyhodnocení nálezů producentů biofilmu na centrálních žilních katétrech

Osídlení zavedeného centrálního žilního katétru (CŽK) mikroorganismy vede k závažným zdravotním komplikacím. O četnosti problému jsme se mohli přesvědčit při zpracovávání výsledků vyšetření CŽK. Během sledovaných pěti let bylo v Thomayerově nemocnici vyšetřeno 1464 CŽK. Přibližně polovina byla osídlena patogenními mikroorganismy. Vyšetřování nálezů na katétrech a testování přítomnosti biofilmu bylo v nemocnici započato již v roce 2010. V této práci jsme začali sledovat vzorky od roku 2012, takže metoda byla praktikována dlouhou dobu před začátkem sběru dat, a nemuseli jsme se obávat ovlivnění výsledků jako u nově zavedených metod.

Mezi běžné původce biofilmu a nález na katétrech patří druhy *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* PK-, *Enterococcus* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* a *Streptococcus viridans*. Fakt, že se jedná o běžné kolonizátory CŽK uváděl i Kokare s kolektivem, jak je uvedeno již v teoretické části (Kokare, Chakraborty et al. 2009).

Vliv na počet nálezů a především jejich klesající trend (**Graf 8-25**) může mít více faktorů. Každý rok nemocnice mění používané dezinfekční prostředky (rotace dezinfekcí) i antimikrobní látky kvůli předcházení vzniku rezistence. Určité látky mohou různě ovlivnit jednotlivé druhy mikrobů, což se nám jeví jako výkyvy počtu nálezů během let. Zdá se, že se změnou těchto látek se podařilo vymýtit méně odolné kmeny bakterií. Vliv mají zajisté také další zlepšující se hygienická opatření a péče o katetry. Vztažení počtu infikovaných katetrů na počet hospitalizací lze brát jako ukazatel zlepšující se péče o katetry v Thomayerově nemocnici (**Graf 8-26**). Počet infikovaných katetrů na 1000 hospitalizací poklesl během sledovaných 5 let přibližně na polovinu.

Mikroorganismy nalezené na CŽK jsou testovány na produkci biofilmu na mikrotitračních destičkách. Technicky není možné vyšetřit biofilm přímo na katétru. Pokud však mikrob biofilm na destičce tvoří, dá se předpokládat, že byl biofilm také vytvořen na zavedeném katétru.

V roce 2015 se procento pozitivních nálezů dostalo pod 50 %, jak ukazuje **Graf 8-13**. Úspěch můžeme přičítat opět zlepšujícím se hygienickým opatřením a kli-

nické péči o katétrů. Tento fakt se projevuje také na tvorbě biofilmu mikrobů. Někteří producenti nedokáží vytvořit biofilm vůbec a tvorbou se projevují pouze částí producenti *Staphylococcus aureus* a další stafylokoky a streptokoky. *Staphylococcus aureus* se naopak objevuje častěji, což by mohlo být způsobeno schopností mutace a rezistence mikroba.

Výsledky může ovlivnit také zastoupení pacientů. Pokud v roce bylo více pacientů přesunuto do nemocnice z jiných zdravotních zařízení, jejich mikroflóra bude mít zajisté odlišné složení než u pacientů přicházejících z prostředí domova. U dlouhodobě hospitalizovaných pacientů bychom očekávali rezistentní mikroby vůči léčbě, což souvisí s tvorbou biofilmu, kde jsou mikroby chráněny.

Postupem času se nicméně zavádí a zkouší nové materiály pro výrobu katétrů nebo ošetření katétrů různými antimikrobními látkami. To může být důvodem snížené tvorby biofilmu u mnohých mikrobů. Mikroby nedokáží k povrchu katétru pak vůbec přisednout a tím dát základ biofilmu.

Ačkoli v roce 2016 počet katétrů stoupá, u procenta pozitivních nálezů sledujeme stále klesající trend. Méně početně zastoupené druhy tvořící biofilm se již nevyskytují (**Graf 8-18**). Mnohé možné důvody již byly řečeny výše. Odolnost zřejmě získává druh *Pseudomonas aeruginosa*, nejeví se však jako častý producent biofilmu.

Na katétrech se mezi roky 2012 a 2016 často objevovaly ještě další druhy mikroorganismů, jako je *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Corynebacterium sp.*, *Proteus mirabilis*, *Sarcina sp.*, *Serratia sp.* nebo *Escherichia coli*. Tyto mikroby však nevynikaly tvorbou biofilmu, formaci netvořily vůbec popřípadě výjimečně v některém roce. Pokud tyto druhy tedy osídlí zavedený CŽK, nastalé komplikace léčby by mohly mít snazší průběh řešení než s přítomným biofilmem, který by mikroby chránil.

Kaur a kolektiv sledovali 115 pacientů se zavedeným CŽK a nemoci s katétrů spojené. Jejich studie probíhala od října 2010 do listopadu 2011. Infekce v krevním řečišti byla prokázána u necelých 22 %, osídleno bylo 62 ze 106 katétrů. Nejčastějším nálezem byl *Staphylococcus aureus* (25,9 %), *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* (20,9 %), *Enterococcus faecalis* (13,6 %), *Pseudomonas aeruginosa* (12,3 %), *non-albicans Candida* (11,1 %), *Escherichia coli* (7,4 %), *Klebsiella pneumoniae* (3,7 %)

a další méně zastoupené kmeny. Výsledky se příliš neliší od našich závěrů (Kaur, Gupta et al. 2015).

Vyšetření katétru se provádí vždy při vytažení z důvodu podezření na infekci. Čím déle je katétr zaveden, tím vyšší je pravděpodobnost mikrobiálního osídlení. Pro zhodnocení tohoto faktoru by bylo nutné znát u každého katétru počet dní, kdy byl zaveden. Získání těchto údajů bylo v rámci této práce nereálné.

9.2 Účinky xanthohumolu na biofilm

Tvorba biofilmu spolu s vyšší rezistencí patogenních mikroorganismů vůči léčbě je významný problém zdravotnictví. Nové možnosti léčby se nehledají pouze mezi moderními chemickými molekulami, ale testují se již známé látky syntetické i přírodní. Cílem našeho experimentu bylo prokázat antibakteriální účinnost xanthohumolu, látky získané z chmelu, a jeho schopnost působit na bakterie žijící ve společenství biofilmu. Pro experiment jsme použili silné a časté producenty biofilmu známé již ze statistického vyhodnocení nálezů na katétrech. XTH má prokázaný antibakteriální, antivirový, antifungální a antiprotozoální účinek (Gerhäuser 2005).

Barvení mikrotitračních destiček krystalovou violetí potvrdilo, že vybrané kmeny jsou producenty biofilmu. Jako nejsilnější producenti z testovaných kmenů se jevíli *Enterococcus faecalis* 890 a *Staphylococcus aureus* 869. K podobným závěrům došel i Kaur a kolektiv. Jejich studie uvádí jako silné producenty biofilmů kmeny druhů rodu *Candida* (mimo *C. albicans*) a druh *Enterobacter faecalis*. Jako slabší producenti biofilmů se ukázaly kmeny bakterií *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* (Kaur, Gupta et al. 2015).

Nabarvený biofilm různých kmenů se lišil již při pozorování pouhým okem, jak vidíme na fotografiích v části výsledků (**Obrázek 8-1, 8-2, 8-3**). Tento jev potvrzuje práce Gupty a kolektivu (2016) a dalších autorů. Celková podoba biofilmu je ovlivněna seskupením mikroorganismů, jejich rozložením a polohou uvnitř biofilmu. Poté se biofilm na dně jamky mikrotitrační destičky jeví jako souvislá vrstva po celém povrchu jamky, usazenina na dně jamky nebo ztluštělá souvislá vrstva.

Ověřovali jsme účinek XTH proti planktonickým bakteriím a bakteriím, které žijí v biofilmu. XTH potlačil či zcela usmrtil obě formy života bakterií. Koncentrace, jež by

ovlivnily chráněné bakterie uvnitř biofilmu, jsou však výrazně vyšší než koncentrace XTH působící na volně žijící kmeny bakterií.

Minimální inhibiční koncentrace XTH na testovací kmeny se pohybovala v rozmezí 13,30-128 µg/ml. Minimální baktericidní koncentrace vykazovala očekávaně vyšší hodnoty (**Tabulka 8-1**). *Staphylococcus aureus* MRSA má MBC z testovaných kmenů nejnižší, průměrná hodnota je 85,30 µg/ml. MBC enterokoků se pohybovaly nad námi zkoušenými koncentracemi, tedy nad 256 µg/ml. Důležitým závěrem je, že testovaná koncentrace XTH má baktericidní účinek na stafylokoky a v uvedené koncentraci potlačuje růst enterokoků.

Studie autora Rozalského a kolektivu se zabývala nejen XTH, ale i dalšími obsahovými látkami z chmelu. Gramnegativní kmeny jsou vůči chmelu odolné. Autoři stanovili mikrodiluční metodou MIC obsahových látek chmelu grampozitivních bakterií *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (MIC 31,3 µg/ml) a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (MIC 62,5 µg/ml). V **Tabulce 9-1** jsou uvedeny hodnoty koncentrace XTH potřebné k inhibici růstu a usmrcení bakterií. Výsledky této studie vykazují hodnoty v podobném rozmezí jako výsledky našeho experimentu (**Tabulka 8-1**). Každý mikrob se chová jedinečně a různé stafylokoky se značně v citlivosti k XTH odlišují. Enterokoky jsou pouze inhibovány, nikoli v testovaných koncentracích usmrceny (Rozalski, Micota et al. 2013).

Tabulka 9-1 Hodnoty MIC a MBC ze studie skupiny Rozalského

Druh mikroorganismu	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>S. aureus</i> 29213	15,00	>500,00
<i>S. aureus</i> D5	125,00	500,00
<i>S. aureus</i> A7	125,00/62,00	250,00
<i>E. faecalis</i> 29212	62,00	>500,00

Zdroj: Rozalski, Micota et al. 2013

Čermák s kolektivem testovali účinek XTH na anaerobní kmeny *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* a *Clostridium difficile*. XTH prokazoval vyšší účinek než ostatní látky získané z chmele, tedy humulon a lupulon. Získané hodnoty MIC a MBC XTH byly v rozmezí 15–107 µg/ml, což jsou koncentrace blízké koncentracím ATB (Čermák, Olšovská et al. 2017).

Srovnání účinku přírodních látek na producenty biofilmu bylo předmětem prací Mohammadi-Sichaniho a kolektivu a Bogdanové s kolektivem. Mohammadi-Sichani a kol. zkoušeli antimikrobní účinek extraktu z duběnek na druh *Streptococcus mutans*. MIC a MBC byly ovlivněny použitým rozpouštědlem. MIC extraktu z duběnek v acetonu byla 160 µg/ml, MBC 320 µg/ml, extrakty v ethanolu a methanolu vykazovaly hodnoty MIC 320 µg/ml a MBC 640 µg/ml (Mohammadi-Sichani, Karbasizadeh et al. 2016). Bogdanová s kolektivem testovali obsahové látky z chmelu proti bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus capitis*. Při měření MIC a MBC získali nízké koncentrace XTH v rozmezí 2-4 µg/ml a MBC 2-7,5 µg/ml (Bogdanová, Röderová et al. 2018). Námi naměřené koncentrace MIC a MBC XTH, které jsme experimentem získali, odpovídaly v závislosti na testovaném druhu bakterie výsledkům obou prací.

Barvení destiček při sledování potlačení tvorby biofilmu bylo pouze orientační. Výsledky mohly být snadno ovlivněny způsobem promytí jamek. Koncentrace XTH potřebná k potlačení uvolňování planktonických bakterií z biofilmu je vyšší než koncentrace účinná vůči planktonickým bakteriím. Stejný poznatek získali i Bogdanová a kol., kdy koncentrace XTH 30 µg/ml potlačila uvolňování z biofilmu minimálně 99,00 % kolonií sledovaných druhů oproti kontrole (Bogdanová, Röderová et al. 2018). XTH proniká do biofilmu nebo se pouze naváže na biofilm a brání uvolnění mikrobů do okolí, což obojí v praxi může znamenat omezení šíření nemoci. Získané hodnoty koncentrace XTH se u testovacích kmenů pohybovaly v rozmezí 188-256 µg/ml (**Tabulka 8-2**). Zákal se neobjevil tam, kde XTH potlačil uvolňování planktonických bakterií z biofilmu. Kvantitativní vyočkování ukázalo, že XTH ve vyšších koncentracích potlačuje uvolňování stafylokoků, na enterokoky však nemá jasný účinek. Nejvyšší koncentrace XTH potlačila uvolnění nejvíce stafylokoků, enterokoky však jasnou závislost mezi koncentrací XTH a inhibicí nevykazují (**Grafy 8-32 až 8-35**). Diskrepance mezi koncentrací XTH inhibující uvol-

ňování bakterií z biofilmu (**Tabulka 8-2**) a počty CFU po vyočkování na krevní agar u enterokoků (**Grafy 8-34, 8-35**) pravděpodobně souvisí s účinky XTH na biofilmové struktury těchto konkrétních kmenů. Vyšší počet CFU v jamkách, které nevykazovaly planktonický růst bakterií, byl pravděpodobně způsoben rozvolněním biofilmu, následným vyočkováním uvolněných biofilmových mas na krevní agar a kultivací bakteriálních buněk z biofilmu.

Další přidání BHI do jamek ukázalo, zda XTH skutečně pronikal do biofilmu. Uvolňování bakterií do samotného BHI bylo potlačeno při předchozích koncentracích XTH v rozmezí 146-224 $\mu\text{g/ml}$ (**Tabulka 8-3**). Bakterie uvnitř biofilmu nicméně přežívají působení XTH a po rozrušení biofilmu mohou opět kolonizovat další tkáň. Tento fakt je zřejmý po mechanickém rozrušení biofilmu a vyočkování jamek na krevní agar. Mohammadi-Sichani s kolektivem sledovali také potlačení biofilmu. Při koncentraci extraktu z duběnek 312,5 $\mu\text{g/ml}$ byla u druhu dubu Mazouj inhibice okolo 80 %, u druhu dubu Ghalghaf téměř 100 % (Mohammadi-Sichani, Karbasizadeh et al. 2016). Podle Bogdanové a kol. koncentrace XTH, která prostoupila do biofilmu a usmrtila kolonie, byla v rozmezí 125 a 60 $\mu\text{g/ml}$ (Bogdanová, Röderová et al. 2018).

Možné odlišnosti výsledných koncentrací od jiných studií s XTH mohou být způsobeny samotnou rostlinou, ze které byl XTH získán. Vliv na účinnost látky může mít odrůda rostliny, oblast pěstování, stáří rostliny, kdy došlo k odběru vzorku XTH, a stáří extraktu. XTH se postupem času rozkládá a jeho účinnost závisí také na obsahu rozkladných produktů, které snižují koncentraci účinné formy.

Významnou roli hrají testovací mikroby. Výsledky námi testovaných bakteriálních kmenů se velmi lišily. V dnešní době mohou být mikroby odolnější a mít vypěstovanou vyšší rezistenci než tomu bylo v dříve prováděných studiích. V naší práci jsme navíc pracovali s mikroby odebranými z katétrů. Mikroorganismy vyskytující se na katétrech jsou často ještě více rezistentní, přizpůsobené k životu patogenu a působící závažná onemocnění. Všechny tyto faktory mohly zapříčinit, že naše výsledné koncentrace byly poměrně vysoké.

Mnohé studie se zabývají účinkem na planktonické bakterie, účinky vůči biofilmu však tolikrát prokazovány nebyly a nelze naše výsledky zcela porovnat.

10 ZÁVĚR

Biofilm je společenství mikroorganismů adherované k určitému povrchu nebo situované ve tkáních či sekretech, obklopené mikroorganismy osobně vyprodukovanou hmotou, tzv. matrix. Před necelými 40 lety začal být tento fenomén spojován s nemocemi a medicínou. Ačkoli je spojení časté a důležité, nebyly doposud nalezeny vhodné metody rutinních vyšetření nebo metody pro denní diagnostické vyšetření vzorků od pacientů. Biofilm může mít však také roli fyziologickou, v podobě ochranné bariéry před patogenními mikroorganismy (Hoiby 2014).

Mezi silné producenty biofilmu patří *Staphylococcus aureus*, jiné druhy stafylokoků a streptokoků. Běžně biofilm tvoří také enterokoky, rod *Klebsiella* a další. Jedná se o kmeny, které jsou častou příčinou onemocnění člověka. Mohou přisedat na tkáň, sliznice nebo umělé zdravotnické pomůcky. Po zavedení katétru je přibližně polovina napadena patogenními mikroorganismy. V případě stafylokoků více než polovina může vytvářet biofilm. Tento jev může znamenat pro pacienta závažné zdravotní komplikace, které nereagují na běžnou léčbu. V letech 2012 až 2016 sledujeme pokles infikovaných katétrů a nižší produkci biofilmu sledovaných producentů biofilmu.

Nové možnosti léčby zahrnují kombinace antibiotických látek, předcházení napadení mikroorganismy dezinfekčními prostředky, použitím speciálních materiálů a hledání nových molekul. Snaha objevit účinný prostředek zachází však i mezi látky již používané a známé a hledají se jejich nové vlastnosti.

Xanthohumol, obsahová látka chmelu, dokáže potlačit šíření stafylokoků z biofilmu. Tím může omezit šíření infekce krevním řečištěm a zamezit vzniku dalších komplikací. Enterokoky ovlivňuje také, ale jejich chování je podstatně více nepředvídatelné. Během experimentu jsme stanovili hodnotu MIC XTH v rozmezí 13,30-128 $\mu\text{g/ml}$, MBC od 85,30 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace inhibující uvolňování bakterií z biofilmu se pohybovala mezi 188,20 $\mu\text{g/ml}$ a 256 $\mu\text{g/ml}$. Po inkubaci 24 hodin průnik do biofilmu signalizovaly koncentrace XTH 146,29 až 224 $\mu\text{g/ml}$. Bakterie uvnitř biofilmu však přežívají ve všech testovaných koncentracích.

Nalezení léčby a prevence tvorby biofilmu je významným cílem. Nadějí blízké budoucnosti je například preventivní očkování (Gupta, Sarkar et al. 2016).

11 SEZNAM TABULEK

TABULKA 6-1 VÝSKYT HLÁŠENÝCH INFEKČNÍCH ONEMOCNĚNÍ V ČESKÉ REPUBLICE, JEŽ BY MOHLA BÝT HYPOTETICKY SPOJENA S TVORBOU BIOFILMU	32
TABULKA 8-1 PRŮMĚRNÉ HODNOTY MIC A MBC ZÍSKANÉ EXPERIMENTEM	85
TABULKA 8-2 PRŮMĚRNÉ KONCENTRACE INHIBUJÍCÍ UVOLŇOVÁNÍ BAKTERIÍ Z BIOFILMU.....	86
TABULKA 8-3 PRŮMĚRNÉ KONCENTRACE PRONIKAJÍCÍ DO BIOFILMU A TAK BRÁNÍCÍ UVOLŇOVÁNÍ PLANKTONICKÝCH BAKTERIÍ.....	89
TABULKA 9-1 HODNOTY MIC A MBC ZE STUDIE SKUPINY ROZALSKÉHO	93

12 SEZNAM GRAFŮ

GRAF 6-1 POČET ČLÁNKŮ NA TÉMA BIOFILM V DATABÁZI PUBMED V LETECH 1975-2016.....	16
GRAF 6-2 METODY VÝZKUMU BIOFILMU S NAZNAČENÍM VÝVOJE	18
GRAF 8-1 KATÉTRY S MIKROBIÁLNÍM NÁLEZEM A BEZ NÁLEZU V ROCE 2012, N=369.....	64
GRAF 8-2 PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ DRUHŮ MIKROORGANISMŮ V ROCE 2012, N=263	65
GRAF 8-3 POČTY KATÉTRŮ S NÁLEZEM MIKROBA A JEHO SCHOPNOST TVOŘIT BIOFILM V ROCE 2012...	66
GRAF 8-4 NÁLEZY STAPHYLOCOCCUS PK- PODLE ODDĚLENÍ V ROCE 2012.....	66
GRAF 8-5 POČET KATÉTRŮ S MIKROBIÁLNÍM NÁLEZEM A BEZ NÁLEZU V ROCE 2013, N=314	67
GRAF 8-6 PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ DRUHŮ MIKROORGANISMŮ V ROCE 2013, N=187	67
GRAF 8-7 POČTY KATÉTRŮ S NÁLEZEM URČITÉHO MIKROBA A JEHO SCHOPNOST TVOŘIT BIOFILM V ROCE 2013	68
GRAF 8-8 NÁLEZY STAPHYLOCOCCUS PK- PODLE ODDĚLENÍ V ROCE 2013.....	69
GRAF 8-9 POČET KATÉTRŮ S MIKROBIÁLNÍM NÁLEZEM A BEZ NÁLEZU V ROCE 2014, N=223	69
GRAF 8-10 PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ DRUHŮ MIKROORGANISMŮ V ROCE 2014, N=120	70
GRAF 8-11 POČTY KATÉTRŮ S NÁLEZEM URČITÉHO MIKROBA A JEHO SCHOPNOST TVOŘIT BIOFILM V ROCE 2014	70
GRAF 8-12 NÁLEZY STAPHYLOCOCCUS PK- PODLE ODDĚLENÍ V ROCE 2014.....	71
GRAF 8-13 POČET KATÉTRŮ S MIKROBIÁLNÍM NÁLEZEM A BEZ NÁLEZU V ROCE 2015, N= 253	71
GRAF 8-14 PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ DRUHŮ MIKROORGANISMŮ V ROCE 2015, N=123	72
GRAF 8-15 POČTY KATÉTRŮ S NÁLEZEM URČITÉHO MIKROBA A JEHO SCHOPNOST TVOŘIT BIOFILM V..	73
GRAF 8-16 NÁLEZU STAPHYLOCOCCUS PK- PODLE ODDĚLENÍ V ROCE 2015	73
GRAF 8-17 POČET KATÉTRŮ S MIKROBIÁLNÍM NÁLEZEM A BEZ NÁLEZU V ROCE 2016, N=305	74
GRAF 8-18 PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ DRUHŮ MIKROORGANISMŮ V ROCE 2016, N=112	74
GRAF 8-19 POČTY KATÉTRŮ S NÁLEZEM URČITÉHO MIKROBA A JEHO SCHOPNOST TVOŘIT BIOFILM V ROCE 2016.....	75
GRAF 8-20 NÁLEZY STAPHYLOCOCCUS PK- PODLE ODDĚLENÍ V ROCE 2016.....	75
GRAF 8-21 POČET KATÉTRŮ S MIKROBIÁLNÍM NÁLEZEM A BEZ V LETECH 2012 – 2016, N=1464	76
GRAF 8-22 PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ DRUHŮ MIKROORGANISMŮ V LETECH 2012 - 2016, N=805....	76
GRAF 8-23 POČTY KATÉTRŮ S NÁLEZEM URČITÉHO MIKROBA A JEHO TVORBA BIOFILMU V LETECH 2012- 2016	77
GRAF 8-24 NÁLEZY STAPHYLOCOCCUS PK- PODLE ODDĚLENÍ V LETECH 2012 – 2016.....	78
GRAF 8-25 VÝVOJ POČTU KATÉTRŮ, KATÉTRŮ S NÁLEZEM PATOGENNÍHO MIKROORGANISMU A KATÉTRŮ S PRODUCENTY BIOFILMU OD ROKU 2012 DO ROKU 2016.....	78
GRAF 8-26 VÝVOJ POČTU KATÉTRŮ, KATÉTRŮ S MIKROBIÁLNÍM NÁLEZEM A KATÉTRŮ S PRODUCENTY BIOFILMU PŘEPOČÍTÁNO NA 1000 HOSPITALIZACÍ V LETECH 2012-2016.....	79
GRAF 8-27 SLEDOVÁNÍ VÝSKYTU NÁLEZU STAPHYLOCOCCUS PK- V LETECH 2012-2016.....	80
GRAF 8-28 SLEDOVÁNÍ VÝSKYTU NÁLEZU KLEBSIELLA SP. V LETECH 2012-2016	80

GRAF 8-29 SLEDOVÁNÍ VÝSKYTU NÁLEZU STAPHYLOCOCCUS AUREUS V LETECH 2012-2016	81
GRAF 8-30 SLEDOVÁNÍ VÝSKYTU NÁLEZU ENTEROCOCCUS SP. V LETECH 2012-2016	81
GRAF 8-31 SLEDOVÁNÍ VÝSKYTU NÁLEZU OSTATNÍCH MIKROORGANISMŮ TVOŘÍCÍCH BIOFILM V LETECH 2012-2016	82
GRAF 8-32 PRŮMĚRNÝ POČET CFU PO VYOČKOVÁNÍ NA KREVNÍ AGAR S. AUREUS 869	87
GRAF 8-33 PRŮMĚRNÝ POČET CFU PO VYOČKOVÁNÍ NA KREVNÍ AGAR S. AUREUS MRSA	87
GRAF 8-34 PRŮMĚRNÝ POČET CFU PO VYOČKOVÁNÍ NA KREVNÍ AGAR E. FAECALIS 881	88
GRAF 8-35 PRŮMĚRNÝ POČET CFU PO VYOČKOVÁNÍ NA KREVNÍ AGAR E. FAECALIS 890	88

13 SEZNAM OBRÁZKŮ

OBRÁZEK 4-1 BIOFILM	13
OBRÁZEK 6-1 STÁDIA TVORBY BIOFILMU	21
OBRÁZEK 6-2 PŘÍKLAD VÝSKYTU BIOFILMU NA LIDSKÉM TĚLE	32
OBRÁZEK 6-3 MODEL INFEKCE CÉVNÍHO KATÉTRU	40
OBRÁZEK 6-4 MOŽNOSTI PŮSOBENÍ PROTI TVORBĚ BIOFILMU	45
OBRÁZEK 6-5 STRUKTURNÍ A MOLEKULOVÝ VZOREC A MOLEKULOVÁ HMOTNOST XANTHOTHUMOLU ..	54
OBRÁZEK 8-1 DETAIL BIOFILMU DRUHŮ STAPHYLOCOCCUS KOAGULÁZA NEGATIVNÍ 829/11+ENTEROKOKY-STAPHYLOCOCCUS KOAGULÁZA NEGATIVNÍ+PROTEUS- STAPHYLOCOCCUS AUREUS 869	83
OBRÁZEK 8-2 DETAIL BIOFILMU DRUHŮ ENTEROCOCCUS FAECALIS 890-ENTEROCOCCUS FAECALIS 124- ENTEROCOCCUS FAECALIS 881	84
OBRÁZEK 8-3 BIOFILM DRUHU STAPHYLOCOCCUS AUREUS MRSA	84
OBRÁZEK 8-4 MIC XANTHOTHUMOLU NA KMEN BAKTERIE STAPHYLOCOCCUS AUREUS MRSA.....	85

14 POUŽITÁ LITERATURA

1. Abreu AC, McBain AJ, Simoes M: **Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents.** *Nat Prod Rep* 2012, **29**:1007-1021.
2. Alem MA, Douglas LJ: **Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**:41-47.
3. Ammendolia MG, Bertuccini L, Iosi F, Minelli F, Berlutti F, Valenti P, Superti F: **Bovine lactoferrin interacts with cable pili of *Burkholderia cenocepacia*.** *Biometals* 2010, **23**:531-542.
4. Annapoorani A, Umamageswaran V, Parameswari R, Pandian SK, Ravi AV: **Computational discovery of putative quorum sensing inhibitors against LasR and RhIR receptor proteins of *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Comput Aided Mol Des* 2012, **26**:1067-1077.
5. Antoniani D, Bocci P, Maciag A, Raffaelli N, Landini P: **Monitoring of diguanylate cyclase activity and of cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, **85**:1095-1104.
6. Anwar H, Costerton JW: **Enhanced activity of combination of tobramycin and piperacillin for eradication of sessile biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*.** *Antimicrob Agents Chemother* 1990, **34**:1666-1671.
7. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME: ***Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease.** *Virulence* 2011, **2**:445-459.
8. Arnold JW, Bailey GW: **Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study.** *Poult Sci* 2000, **79**:1839-1845.
9. Attila C, Ueda A, Wood TK: **5-Fluorouracil reduces biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through global regulator AriR as an antivirulence compound.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2009, **82**:525-533.
10. Banu A, Noorul Hassan MM, Rajkumar J, Srinivasa S: **Spectrum of bacteria associated with diabetic foot ulcer and biofilm formation: A prospective study.** *Australas Med J* 2015, **8**:280-285.
11. Beikler T, Flemmig TF: **Oral biofilm-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures.** *Periodontol 2000* 2011, **55**:87-103.
12. Bijtenhoorn P, Schipper C, Hornung C, Quitschau M, Grond S, Weiland N, Streit WR: **BpiB05, a novel metagenome-derived hydrolase acting on N-acylhomoserine lactones.** *J Biotechnol* 2011, **155**:86-94.
13. Bjarnsholt T, Ciofu O, Molin S, Givskov M, Hoiby N: **Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed?** *Nat Rev Drug Discov* 2013, **12**:791-808.
14. Bjarnsholt T, Jensen PO, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, Pressler T, Givskov M, Hoiby N: ***Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients.** *Pediatr Pulmonol* 2009, **44**:547-558.
15. Bjarnsholt T: **The role of bacterial biofilms in chronic infections.** *APMIS Suppl* 2013:1-51.
16. Bogdanová K, Röderová M, Kolar M, Langová K, Dusek M, Jost P, Kubelková K, Bostik P, Olšovská J: **Antibiofilm activity of bioactive hop compounds humulone, lupulone and xanthohumol toward susceptible and resistant staphylococci.** *Research in Microbiology* (2018), doi:10.1016/j.resmic.2017.12.005.
17. Boles BR, Singh PK: **Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:12503-12508.

18. Bordi C, de Bentzmann S: **Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge.** *Ann Intensive Care* 2011, **1**:19.
19. Borges SF, Silva JG, Teixeira PC: **Survival and biofilm formation of *Listeria monocytogenes* in simulated vaginal fluid: influence of pH and strain origin.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011, **62**:315-320.
20. Bruellhoff K, Fiedler J, Moller M, Groll J, Brenner RE: **Surface coating strategies to prevent biofilm formation on implant surfaces.** *Int J Artif Organs* 2010, **33**:646-653.
21. Cai JN, Jung JE, Dang MH, Kim MA, Yi HK, Jeon JG: **Functional Relationship between Sucrose and a Cariogenic Biofilm Formation.** *PLoS One* 2016, **11**:e0157184.
22. Carson L, Gorman SP, Gilmore BF: **The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010, **59**:447-455.
23. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A: **The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms.** *J Clin Microbiol* 1999, **37**:1771-1776.
24. Čermák P, Olšovská J, Mikyska A, Dušek M, Kadlečková Z, Vaníček J, Nyc O, Sigler K, Bostiková V, Bostik P: **Strong antimicrobial activity of xanthohumol and other derivatives from hops (*Humulus lupulus* L.) on gut anaerobic bacteria.** *APMIS* 2017, **125**:1033-1038.
25. Ciofu O, Giwercman B, Walter-Rasmussen J, Pressler T, Pedersen SS, Hoiby N: **Antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal beta-lactamase in patients with cystic fibrosis are markers of the development of resistance of *P. aeruginosa* to beta-lactams.** *J Antimicrob Chemother* 1995, **35**:295-304.
26. Ciofu O, Tolker-Nielsen T, Jensen PO, Wang H, Hoiby N: **Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients.** *Adv Drug Deliv Rev* 2015, **85**:7-23.
27. Colagiorgi A, Di Ciccio P, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A: **A Look inside the *Listeria monocytogenes* Biofilms Extracellular Matrix.** *Microorganisms* 2016, **4**.
28. Conrady DG, Brescia CC, Horii K, Weiss AA, Hassett DJ, Herr AB: **A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:19456-19461.
29. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ: **Bacterial biofilms in nature and disease.** *Annu Rev Microbiol* 1987, **41**:435-464.
30. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP: **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.** *Science* 1999, **284**:1318-1322.
31. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F: **The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation.** *Infect Immun* 1999, **67**:5427-5433.
32. Daniel M, Imtiaz-Umer S, Fergie N, Birchall JP, Bayston R: **Bacterial involvement in otitis media with effusion.** *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2012, **76**:1416-1422.
33. Davies DG, Marques CN: **A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms.** *J Bacteriol* 2009, **191**:1393-1403.
34. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP: **The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm.** *Science* 1998, **280**:295-298.
35. de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z: **Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport.** *Biotechnol Bioeng* 1994, **43**:1131-1138.
36. de Boer W, Gunnewick RJAK, Veenhuis M, Bock E, Laanbroeck HJ: **Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria.** *Appl. Environ. Microbiol.* 1991, **57**:3600-3604.

37. Dean SN, van Hoek ML: **Screen of FDA-approved drug library identifies maprotiline, an antibiofilm and antivirulence compound with QseC sensor-kinase dependent activity in Francisella novicida.** *Virulence* 2015, **6**:487-503.
38. Del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Duarte MA, de Moura MR, Aouada FA, Kishen A: **Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin.** *Restor Dent Endod* 2015, **40**:195-201.
39. Diaz-Garrido N, Lozano C, Giacaman RA: **Frequency of sucrose exposure on the cariogenicity of a biofilm-caries model.** *Eur J Dent* 2016, **10**:345-350.
40. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA: **Microtiter plate assay for assessment of Listeria monocytogenes biofilm formation.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**:2950-2958.
41. Dotto C, Lombarte Serrat A, Cattelan N, Barbagelata MS, Yantorno OM, Sordelli DO, Ehling-Schulz M, Grunert T, Buzzola FR: **The Active Component of Aspirin, Salicylic Acid, Promotes Staphylococcus aureus Biofilm Formation in a PIA-dependent Manner.** *Front Microbiol* 2017, **8**:4.
42. Dunne WM, Jr.: **Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?** *Clin Microbiol Rev* 2002, **15**:155-166.
43. Edwards KJ, Bond PL, Gihring TM, Banfield JF: **An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage.** *Science* 2000, **287**:1796-1799.
44. Elder MJ, Stapleton F, Evans E, Dart JK: **Biofilm-related infections in ophthalmology.** *Eye (Lond)* 1995, **9 (Pt 1)**:102-109.
45. Elkhatib WF, Haynes VL, Noreddin AM: **Unexpected induction of resistant Pseudomonas aeruginosa biofilm to fluoroquinolones by diltiazem: a new perspective of microbiological drug-drug interaction.** *J Infect Public Health* 2008, **1**:105-112.
46. Faria S, Joao I, Jordao L: **General Overview on Nontuberculous Mycobacteria, Biofilms, and Human Infection.** *J Pathog* 2015, **2015**:809014.
47. Feldman MF, Wacker M, Hernandez M, Hitchen PG, Marolda CL, Kowarik M, Morris HR, Dell A, Valvano MA, Aebi M: **Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in Escherichia coli.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:3016-3021.
48. Fields BS, Benson RF, Besser RE: **Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation.** *Clin Microbiol Rev* 2002, **15**:506-526.
49. Foreman A, Wormald PJ: **Different biofilms, different disease? A clinical outcomes study.** *Laryngoscope* 2010, **120**:1701-1706.
50. Fraimow HS: **Systemic antimicrobial therapy in osteomyelitis.** *Semin Plast Surg* 2009, **23**:90-99.
51. Frieri M, Kumar K, Boutin A: **Antibiotic resistance.** *J Infect Public Health* 2017, **10**:369-378.
52. Gallo PM, Rapsinski GJ, Wilson RP, Oppong GO, Sriram U, Goulian M, Buttaro B, Caricchio R, Gallucci S, Tukul C: **Amyloid-DNA Composites of Bacterial Biofilms Stimulate Autoimmunity.** *Immunity* 2015, **42**:1171-1184.
53. Garrett TR, Bhakoo M, Zhang Z: **Characterisation of bacterial adhesion and removal in a flow chamber by micromanipulation measurements.** *Biotechnol Lett* 2008, **30**:427-433.
54. Gerhäuser C: **Broad spectrum antiinfective potential of xanthohumol from hop (Humulus lupulus L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites.** *Mol Nutr Food Res* 2005, **49**:827-831.
55. Gloag ES, Elbadawi C, Zachreson CJ, Aharonovich I, Toth M, Charles IG, Turnbull L, Whitchurch CB: **Micro-Patterned Surfaces That Exploit Stigmergy to Inhibit Biofilm Expansion.** *Front Microbiol* 2016, **7**:2157.
56. Gottenbos B, van der Mei HC, Klatter F, Nieuwenhuis P, Busscher HJ: **In vitro and in vivo antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber.** *Biomaterials* 2002, **23**:1417-1423.

57. Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P: **Biofilm, pathogenesis and prevention--a journey to break the wall: a review.** *Arch Microbiol* 2016, **198**:1-15.
58. Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, Nistico L, Nguyen D, Hayes J, Forbes M, Greenberg DP, Dice B, Burrows A, et al.: **Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media.** *JAMA* 2006, **296**:202-211.
59. Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, Hoiby N, Moser C, Costerton JW, Moter A, Bjarnsholt T: **Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012, **65**:127-145.
60. Hansson C, Hoborn J, Moller A, Swanbeck G: **The microbial flora in venous leg ulcers without clinical signs of infection. Repeated culture using a validated standardised microbiological technique.** *Acta Derm Venereol* 1995, **75**:24-30.
61. Hartmann A, Schikora A: **Quorum sensing of bacteria and trans-kingdom interactions of N-acyl homoserine lactones with eukaryotes.** *J Chem Ecol* 2012, **38**:704-713.
62. Hassett DJ, Korfhagen TR, Irvin RT, Schurr MJ, Sauer K, Lau GW, Sutton MD, Yu H, Hoiby N: **Pseudomonas aeruginosa biofilm infections in cystic fibrosis: insights into pathogenic processes and treatment strategies.** *Expert Opin Ther Targets* 2010, **14**:117-130.
63. Henrici AT: **Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique.** *J Bacteriol* 1933, **25**:277-287.
64. Hetrick EM, Shin JH, Paul HS, Schoenfisch MH: **Anti-biofilm efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles.** *Biomaterials* 2009, **30**:2782-2789.
65. Hirota K, Yumoto H, Sapaar B, Matsuo T, Ichikawa T, Miyake Y: **Pathogenic factors in Candida biofilm-related infectious diseases.** *J Appl Microbiol* 2017, **122**:321-330.
66. Hoffmann N, Lee B, Hentzer M, Rasmussen TB, Song Z, Johansen HK, Givskov M, Hoiby N: **Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of Pseudomonas aeruginosa and attenuates chronic P. aeruginosa lung infection in Cftr(-/-) mice.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**:3677-3687.
67. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O: **Antibiotic resistance of bacterial biofilms.** *Int J Antimicrob Agents* 2010, **35**:322-332.
68. Hoiby N: **A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections.** *Pathog Dis* 2014, **70**:205-211.
69. Honorato-Sampaio K, Guedes AC, Lima VL, Borges EL: **Bacterial biofilm in chronic venous ulcer.** *Braz J Infect Dis* 2014, **18**:350-351.
70. Humblot V, Yala JF, Thebault P, Boukerma K, Hequet A, Berjeaud JM, Pradier CM: **The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers.** *Biomaterials* 2009, **30**:3503-3512.
71. Jagnow J, Clegg S: **Klebsiella pneumoniae MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces.** *Microbiology* 2003, **149**:2397-2405.
72. Jahodář L: **Farmakobotanika semenné rostliny** Edited by: Karolinum; 2016:86,87. ISBN 978-80-246-1791-6
73. Jakobsen TH, van Gennip M, Phipps RK, Shanmugham MS, Christensen LD, Alhede M, Skindersoe ME, Rasmussen TB, Friedrich K, Uthe F, et al.: **Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing.** *Antimicrob Agents Chemother* 2012, **56**:2314-2325.
74. Jelínek L, Karabín M, Kinčl T, Hudcová T, Kotlíková B, Dostálek P: **Xanthohumol: Possible Isolation and Beer Enrichment.** *Chem. Listy* 2013, **107**.
75. Jendresen MD, Glantz PO: **Clinical adhesiveness of selected dental materials. An in-vivo study.** *Acta Odontol Scand* 1981, **39**:39-45.
76. Jonas K, Melefors O, Romling U: **Regulation of c-di-GMP metabolism in biofilms.** *Future Microbiol* 2009, **4**:341-358.
77. Karatan E, Watnick P: **Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2009, **73**:310-347.

78. Kaur M, Gupta V, Gombar S, Chander J, Sahoo T: **Incidence, risk factors, microbiology of venous catheter associated bloodstream infections--a prospective study from a tertiary care hospital.** *Indian J Med Microbiol* 2015, **33**:248-254.
79. Kazemzadeh-Narbat M, Kindrachuk J, Duan K, Jenssen H, Hancock RE, Wang R: **Anti-microbial peptides on calcium phosphate-coated titanium for the prevention of implant-associated infections.** *Biomaterials* 2010, **31**:9519-9526.
80. Khoo X, Hamilton P, O'Toole GA, Snyder BD, Kenan DJ, Grinstaff MW: **Directed assembly of PEGylated-peptide coatings for infection-resistant titanium metal.** *J Am Chem Soc* 2009, **131**:10992-10997.
81. Khundkar R, Malic C, Burge T: **Use of Acticoat dressings in burns: what is the evidence?** *Burns* 2010, **36**:751-758.
82. Kim HS, Park HD: **Ginger extract inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14.** *PLoS One* 2013, **8**:e76106.
83. Klaban V: **Ekologie mikroorganismů.** In *Galén*. Edited by Houdek L, PhDr.: Galén; 2011:70-71. vol 1.] ISBN 978-80-7262-770-7
84. Klaban V: **Obecná a environmentální mikrobiologie.** Gaudeamus, Hradec Králové, 2018, 386 s. ISBN 978-80-7435-673-5
85. Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jorgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T: **Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants.** *Mol Microbiol* 2003, **48**:1511-1524.
86. Klener P: In *Vnitřní lékařství*. Edited by: Galén; 2006:292,293,294,366,367. vol 3.]
87. Kobayashi N, Bauer TW, Tuohy MJ, Fujishiro T, Procop GW: **Brief ultrasonication improves detection of biofilm-formative bacteria around a metal implant.** *Clin Orthop Relat Res* 2007, **457**:210-213.
88. Kokare C, Chakraborty S, Khopade A, Mahadik K: **Biofilm: importance and applications.** *Indian J Biotechnol* 2009, **8**:159-168.
89. Kramer B, Thielmann J, Hickisch A, Muranyi P, Wunderlich J, Hauser C: **Antimicrobial activity of hop extracts against foodborne pathogens for meat applications.** *J Appl Microbiol* 2015, **118**:648-657.
90. Kumon H, Tomochika K, Matunaga T, Ogawa M, Ohmori H: **A sandwich cup method for the penetration assay of antimicrobial agents through *Pseudomonas* exopolysaccharides.** *Microbiol Immunol* 1994, **38**:615-619.
91. Lamont RJ, Jenkinson HF: **Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1998, **62**:1244-1263.
92. Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE: **Optical sectioning of microbial biofilms.** *J Bacteriol* 1991, **173**:6558-6567.
93. Lehtola MJ, Torvinen E, Kusnetsov J, Pitkanen T, Maunula L, von Bonsdorff CH, Martikainen PJ, Wilks SA, Keevil CW, Miettinen IT: **Survival of *Mycobacterium avium*, *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, and caliciviruses in drinking water-associated biofilms grown under high-shear turbulent flow.** *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**:2854-2859.
94. Lenaerts AJ, Hoff D, Aly S, Ehlers S, Andries K, Cantarero L, Orme IM, Basaraba RJ: **Location of persisting mycobacteria in a Guinea pig model of tuberculosis revealed by r207910.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**:3338-3345.
95. Li X, Contreras-Garcia A, LoVetri K, Yakandawala N, Wertheimer MR, De Crescenzo G, Hoemann CD: **Fusion peptide P15-CSP shows antibiofilm activity and pro-osteogenic activity when deposited as a coating on hydrophilic but not hydrophobic surfaces.** *J Biomed Mater Res A* 2015, **103**:3736-3746.
96. Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R: **The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis.** *J Bacteriol* 1996, **178**:175-183.

97. Mack WN, Mack JP, Ackerson AO: **Microbial film development in a trickling filter.** *Microb Ecol* 1975, **2**:215-226.
98. Madeo J, Frieri M: **Bacterial biofilms and chronic rhinosinusitis.** *Allergy Asthma Proc* 2013, **34**:335-341.
99. Machado D, Castro J, Palmeira-de-Oliveira A, Martinez-de-Oliveira J, Cerca N: **Bacterial Vaginosis Biofilms: Challenges to Current Therapies and Emerging Solutions.** *Front Microbiol* 2015, **6**:1528.
100. Mandel EM, Doyle WJ, Winther B, Alper CM: **The incidence, prevalence and burden of OM in unselected children aged 1-8 years followed by weekly otoscopy through the "common cold" season.** *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2008, **72**:491-499.
101. Massol-Deya AA, Whallon J, Hickey RF, Tiedje JM: **Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater.** *Appl Environ Microbiol* 1995, **61**:769-777.
102. Mohammadi-Sichani M, Karbasizadeh V, Dokhaharani SC: **Evaluation of biofilm removal activity of Quercus infectoria galls against Streptococcus mutans.** *Dent Res J (Isfahan)* 2016, **13**:46-51.
103. Mojsoska B, Jenssen H: **Peptides and Peptidomimetics for Antimicrobial Drug Design.** *Pharmaceuticals (Basel)* 2015, **8**:366-415.
104. Mottola C, Mendes JJ, Cristino JM, Cavaco-Silva P, Tavares L, Oliveira M: **Polymicrobial biofilms by diabetic foot clinical isolates.** *Folia Microbiol (Praha)* 2016, **61**:35-43.
105. Nostro A, Guerrini A, Marino A, Tacchini M, Di Giulio M, Grandini A, Akin M, Cellini L, Bisignano G, Saracoglu HT: **In vitro activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria.** *Int J Food Microbiol* 2016, **238**:33-39.
106. O'Donnell LE, Smith K, Williams C, Nile CJ, Lappin DF, Bradshaw D, Lambert M, Robertson DP, Bagg J, Hannah V, et al.: **Dentures are a Reservoir for Respiratory Pathogens.** *J Prosthodont* 2016, **25**:99-104.
107. Ogawa A, Furukawa S, Fujita S, Mitobe J, Kawarai T, Narisawa N, Sekizuka T, Kuroda M, Ochiai K, Ogihara H, et al.: **Inhibition of Streptococcus mutans biofilm formation by Streptococcus salivarius FruA.** *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**:1572-1580.
108. Ojha AK, Baughn AD, Sambandan D, Hsu T, Trivelli X, Guerardel Y, Alahari A, Kremer L, Jacobs WR, Jr., Hatfull GF: **Growth of Mycobacterium tuberculosis biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria.** *Mol Microbiol* 2008, **69**:164-174.
109. Olejníčková K, Holá V: **Porovnání produkce vybraných faktorů virulence Pseudomonas aeruginosa izolovaných z katétrů.** *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 2012, **61**:21-28.
110. Osmon DR, Barbari EF: **Outpatient intravenous antimicrobial therapy for the practicing orthopaedic surgeon.** *Clin Orthop Relat Res* 2002:80-86.
111. Overman PR: **Biofilm: a new view of plaque.** *J Contemp Dent Pract* 2000, **1**:18-29.
112. Patterson JL, Stull-Lane A, Girerd PH, Jefferson KK: **Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of Gardnerella vaginalis relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes.** *Microbiology* 2010, **156**:392-399.
113. Pirrone M, Pinciroli R, Berra L: **Microbiome, biofilms, and pneumonia in the ICU.** *Curr Opin Infect Dis* 2016, **29**:160-166.
114. Podschun R, Ullmann U: **Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors.** *Clin Microbiol Rev* 1998, **11**:589-603.
115. Qureishi A, Lee Y, Belfield K, Birchall JP, Daniel M: **Update on otitis media - prevention and treatment.** *Infect Drug Resist* 2014, **7**:15-24.
116. Reeves EP, McCarthy C, McElvaney OJ, Vijayan MS, White MM, Dunlea DM, Pohl K, Lacey N, McElvaney NG: **Inhaled hypertonic saline for cystic fibrosis: Reviewing the potential evidence for modulation of neutrophil signalling and function.** *World J Crit Care Med* 2015, **4**:179-191.

117. Reslinski A, Dabrowiecki S, Glowacka K: **The impact of diclofenac and ibuprofen on biofilm formation on the surface of polypropylene mesh.** *Hernia* 2015, **19**:179-185.
118. Ribeiro SM, Felicio MR, Boas EV, Goncalves S, Costa FF, Samy RP, Santos NC, Franco OL: **New frontiers for anti-biofilm drug development.** *Pharmacol Ther* 2016, **160**:133-144.
119. Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW: **Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of Legionella pneumophila in a model potable water system containing complex microbial flora.** *Appl Environ Microbiol* 1994, **60**:1585-1592.
120. Rozalski M, Micota B, Sadowska B, Stochmal A, Jedrejek D, Wieckowska-Szakiel M, Rozańska B: **Antiadherent and antibiofilm activity of Humulus lupulus L. derived products: new pharmacological properties.** *Biomed Res Int* 2013, **2013**:101089.
121. Seth AK, Zhong A, Nguyen KT, Hong SJ, Leung KP, Galiano RD, Mustoe TA: **Impact of a novel, antimicrobial dressing on in vivo, Pseudomonas aeruginosa wound biofilm: quantitative comparative analysis using a rabbit ear model.** *Wound Repair Regen* 2014, **22**:712-719.
122. Shokouhfard M, Kermanshahi RK, Shahandashti RV, Feizabadi MM, Teimourian S: **The inhibitory effect of a Lactobacillus acidophilus derived biosurfactant on biofilm producer Serratia marcescens.** *Iran J Basic Med Sci* 2015, **18**:1001-1007.
123. Schauder S, Bassler BL: **The languages of bacteria.** *Genes Dev* 2001, **15**:1468-1480.
124. Schiffman JD, Elimelech M: **Antibacterial activity of electrospun polymer mats with incorporated narrow diameter single-walled carbon nanotubes.** *ACS Appl Mater Interfaces* 2011, **3**:462-468.
125. Schink B: **Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1997, **61**:262-280.
126. Schlech WF, 3rd, Lavigne PM, Bortolussi RA, Allen AC, Haldane EV, Wort AJ, Hightower AW, Johnson SE, King SH, Nicholls ES, et al.: **Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food.** *N Engl J Med* 1983, **308**:203-206.
127. Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C: **Role of type 1 and type 3 fimbriae in Klebsiella pneumoniae biofilm formation.** *BMC Microbiol* 2010, **10**:179.
128. Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ: **A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development.** *Nature* 2002, **417**:552-555.
129. Slobodníková L, Hupková H, Koreň J, Záborská M: **Vplyv prípravkov určených na dezinfekciu kože, slizníc a rán na životaschopnosť biofilmovej formy rastu mikroorganizmov izolovaných od pacientov s katérovými infekciami.** *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2014, **63**:168-172.
130. Souza JC, Mota RR, Sordi MB, Passoni BB, Benfatti CA, Magini RS: **Biofilm Formation on Different Materials Used in Oral Rehabilitation.** *Braz Dent J* 2016, **27**:141-147.
131. Stephenson MF, Mfunu L, Dowd SE, Wolcott RD, Barbeau J, Poisson M, James G, Desrosiers M: **Molecular characterization of the polymicrobial flora in chronic rhinosinusitis.** *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2010, **39**:182-187.
132. Stewart PS, Costerton JW: **Antibiotic resistance of bacteria in biofilms.** *Lancet* 2001, **358**:135-138.
133. Swidsinski A, Dorffel Y, Loening-Baucke V, Schilling J, Mendling W: **Response of Gardnerella vaginalis biofilm to 5 days of moxifloxacin treatment.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011, **61**:41-46.
134. Tan T, Wu D, Li W, Zheng X, Li W, Shan A: **High Specific Selectivity and Membrane-Active Mechanism of Synthetic Cationic Hybrid Antimicrobial Peptides Based on the Peptide FV7.** *Int J Mol Sci* 2017, **18**.
135. Tribedi P, Gupta AD, Sil AK: **Adaptation of Pseudomonas sp. AKS2 in biofilm on low-density polyethylene surface: an effective strategy for efficient survival and polymer degradation.** *Bioresources and Bioprocessing* 2015, **2**:1-10.

136. Tribedi P, Sil AK: **Cell surface hydrophobicity: a key component in the degradation of polyethylene succinate by Pseudomonas sp. AKS2.** *J Appl Microbiol* 2014, **116**:295-303.
137. Turos E, Shim JY, Wang Y, Greenhalgh K, Reddy GS, Dickey S, Lim DV: **Antibiotic-conjugated polyacrylate nanoparticles: new opportunities for development of anti-MRSA agents.** *Bioorg Med Chem Lett* 2007, **17**:53-56.
138. Večeřová R, Bogdanová K, Rejman D, Gallo J, Kolar M: **[Effect of lipophosphonoxins on inhibition of bacterial colonization of bone cements].** *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2016, **65**:171-176.
139. Vecitis CD, Zodrow KR, Kang S, Elimelech M: **Electronic-structure-dependent bacterial cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes.** *ACS Nano* 2010, **4**:5471-5479.
140. Venkateshbabu N, Anand S, Abarajithan M, Sheriff SO, Jacob PS, Sonia N: **Natural Therapeutic Options in Endodontics - A Review.** *Open Dent J* 2016, **10**:214-226.
141. Ventolini G: **Vaginal Lactobacillus: biofilm formation in vivo - clinical implications.** *Int J Womens Health* 2015, **7**:243-247.
142. Vojáček J, Kettner J: In *Klinická kardiologie*. Edited by: Nucleus; 2009:553.
143. von Eiff C, Heilmann C, Herrmann M, Peters G: **Basic aspects of the pathogenesis of staphylococcal polymer-associated infections.** *Infection* 1999, **27 Suppl 1**:S7-10.
144. von Wintersdorff CJ, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, Savelkoul PH, Wolffs PF: **Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer.** *Front Microbiol* 2016, **7**:173.
145. Wakeman CA, Moore JL, Noto MJ, Zhang Y, Singleton MD, Prentice BM, Gilston BA, Doster RS, Gaddy JA, Chazin WJ, et al.: **The innate immune protein calprotectin promotes Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus interaction.** *Nat Commun* 2016, **7**:11951.
146. Wang BY, Deutch A, Hong J, Kuramitsu HK: **Proteases of an early colonizer can hinder Streptococcus mutans colonization in vitro.** *J Dent Res* 2011, **90**:501-505.
147. Wang LS, Gupta A, Rotello VM: **Nanomaterials for the Treatment of Bacterial Biofilms.** *ACS Infect Dis* 2016, **2**:3-4.
148. Waters V, Smyth A: **Cystic fibrosis microbiology: Advances in antimicrobial therapy.** *J Cyst Fibros* 2015, **14**:551-560.
149. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS: **Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation.** *Science* 2002, **295**:1487.
150. Wolcott RD, Rumbaugh KP, James G, Schultz G, Phillips P, Yang Q, Watters C, Stewart PS, Dowd SE: **Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time- dependent therapeutic window.** *J Wound Care* 2010, **19**:320-328.
151. Wu H, Moser C, Wang HZ, Hoiby N, Song ZJ: **Strategies for combating bacterial biofilm infections.** *Int J Oral Sci* 2015, **7**:1-7.
152. Wu HY, Zhang XL, Pan Q, Wu J: **Functional selection of a type IV pili-binding peptide that specifically inhibits Salmonella Typhi adhesion to/invasion of human monocytic cells.** *Peptides* 2005, **26**:2057-2063.
153. Xavier JB, Foster KR: **Cooperation and conflict in microbial biofilms.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:876-881.
154. Yang L, Liu Y, Wu H, Song Z, Hoiby N, Molin S, Givskov M: **Combating biofilms.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012, **65**:146-157.
155. Yuan S, Wan D, Liang B, Pehkonen SO, Ting YP, Neoh KG, Kang ET: **Lysozyme-coupled poly(poly(ethylene glycol) methacrylate)-stainless steel hybrids and their antifouling and antibacterial surfaces.** *Langmuir* 2011, **27**:2761-2774.
156. Ziran BH: **Osteomyelitis.** *J Trauma* 2007, **62**:S59-60.
157. Zobell CE, Allen EC: **The Significance of Marine Bacteria in the Fouling of Submerged Surfaces.** *J Bacteriol* 1935, **29**:239-251.

15 INTERNETOVÉ ZDROJE

Čermák P.: Klinická mikrobiologie-biofilm. Dostupné z

http://ukb.lf1.cuni.cz/ppt/cermak/klinicka_mikrobiologie-biofilm.pdf

Daidalea: <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSpecies.asp?id=10079>

PubMed: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=biofilm>

Státní zdravotní ústav: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2006-2015-absolute>