

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd



Optimalizace metody vedoucí k hodnocení citlivosti biofilm formujících stafylokoků vůči kandidátním antimikrobním látkám

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Hradec Králové, 2019

Bc. Adéla Diepoltová

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, 15. 5. 2019

Bc. Adéla Diepoltová

Za odborné rady, připomínky a komentáře k formální i obsahové stránce této práce děkuji RNDr. Kláře Konečné, Ph.D. Za korekci a psychickou podporu vděčím Bc. Lucii Moravcové. Velký dík za trpělivost a oporu patří také rodině, příteli a přátelům.

Obsah

1. ABSTRAKT	6
2. ABSTRACT	7
3. SEZNAM ZKRATEK	8
4. ÚVOD	10
5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	12
6. TEORETICKÁ ČÁST	13
6.1. BIOFILMY	13
6.1.1. Vznik a vývoj biofilmu	14
6.1.1.1. Adheze	14
6.1.1.2. Maturace	16
6.1.1.3. Architektura biofilmu	16
6.1.1.4. Disperze	17
6.1.2. „Quorum sensing“	18
6.1.3. Rezistence biofilmu k antimikrobním látkám	19
6.1.3.1. Mechanismy rezistence	19
6.2. BIOFILMY TVOŘENÉ STAFYLOKOKY	21
6.3. INFEKCE SPOJENÉ S VÝSKYTEM BIOFILMU.....	23
6.3.1. Infekční endokarditida	24
6.3.2. Osteomyelitida	24
6.3.3. Infekce očí	25
6.3.4. Infekce ran	26
6.3.5. Infekce z kontaminace lékařských nástrojů.....	27
6.3.5.1. Kontaminace cévních katetrů	27
6.3.5.2. Kontaminace močových katetrů.....	30
6.3.5.3. Kontaminace kloubního implantátu.....	32
6.4. <i>IN VITRO</i> BIOFILMOVÉ MODELY	33
6.4.1. Uzavřené <i>in vitro</i> biofilmové modely	33
6.4.1.1. Model biofilmu kolonie na agaru	34
6.4.1.2. Model biofilmu v mikrotitrační destičce	34
6.4.1.3. The Calgary Biofilm Device	35
6.4.2. Otevřené <i>in vitro</i> modely	36
6.4.2.1. Průtoková komora	37
6.4.2.2. Chemostat	37
6.4.2.3. CDC biofilmový reaktor.....	38
6.4.3. Modely experimentálního mikrokosmu	39
6.5. VIZUALIZACE BIOFILMŮ.....	39

6.5.1.	Konfokální laserová skenovací mikroskopie	39
6.5.2.	Kvantifikace biofilmů	41
6.5.2.1.	Kvantifikace biomasy	41
6.5.2.1.1.	Barvení krystalovou violetí	41
6.5.2.1.2.	Barvení fluoroforem Syto 9.....	41
6.5.2.2.	Kvantifikace živých buněk	42
6.5.2.2.1.	LIVE/DEAD™ BacLight™	42
6.5.2.2.2.	XTT esej.....	43
6.5.2.3.	Kvantifikace matrix biofilmu	44
7.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	45
7.1.	EXPERIMENT 1	45
	Pomůcky a materiál	46
7.1.2.	Použité bakteriální kmeny	48
7.1.3.	Příprava médií	48
7.1.3.1.	Soyabean médium.....	48
7.1.3.2.	Suplementace kultivačních médií	49
7.1.4.	Pracovní postup.....	50
7.1.5.	Hodnocení a výsledky.....	53
7.1.5.1.	Kvantifikace celkové biofilmové biomasy krystalovou violetí	53
7.1.5.2.	Volba místa formace biofilmu	62
7.1.5.3.	Volba inkubačního média	63
7.1.5.4.	Volba denzity původní suspenze	66
7.1.5.5.	Volba módu inkubace	67
7.2.	EXPERIMENT 2	68
	Pomůcky a materiál	68
1.1.1.	Použité klinické izoláty	69
1.1.2.	Příprava média Soyabean + PP.....	70
1.1.3.	Pracovní postup.....	70
1.1.4.	Hodnocení a výsledky.....	72
8.	DISKUZE	77
9.	ZÁVĚR.....	81
10.	SEZNAM OBRÁZKŮ, SCHÉMAT A TABULEK	83
11.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	85

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní program: Zdravotnická bioanalytika

Autor: Bc. Adéla Diepoltová

Školitel: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Název diplomové práce: Optimalizace metody vedoucí k hodnocení citlivosti biofilm formujících stafylokoků vůči kandidátním antimikrobním látkám

Cíl práce: Cílem práce bylo optimalizovat postup *in vitro* formace stafylokokových biofilmů na kolíčcích a v jamkách šestadevadesáti jamkové mikrotitrační destičky dle vzoru komerčně dostupného systému *The Calgary Biofilm Device*. V Experimentu 1 bylo třeba optimalizovat podmínky inkubace (vlivu média, módu inkubace, optické denzity počáteční bakteriální suspenze a vlivu místa formace biofilmu v rámci systému) vedoucí k maximálnímu nárůstu biofilmové masy dvou stafylokokových kmenů s neznámým biofilmovým fenotypem a u jednoho kmene definovaného jako silný producent biofilmu. Nejvhodnější kombinace podmínek byla využita při inkubaci klinických izolátů v Experimentu 2. Sbírkové klinické izoláty bylo cílem rozdělit do kategorií dle schopnosti formace biofilmu. Práce by měla navrhnout postup *in vitro* formace maximálně objemných stafylokokových biofilmů vhodných k hodnocení citlivosti vůči kandidátním antimikrobním látkám.

Metody: Hodnocení schopnosti formace stafylokokových biofilmů probíhalo spektrofotometricky, měřením intenzity extrahované krystalové violeti v jamkách mikrotitrační destičky s tepelně a chemicky fixovanou suspenzí stafylokoků.

Výsledky: V Experimentu 1 byla ověřena schopnost tvorby biofilmu u všech tří testovaných kmenů. Jako nejvhodnější inkubační médium bylo zvoleno Soyabean médium suplementované prasečí plazmou. Nejlepší výsledky dále zajistil mód inkubace se stálým mícháním suspenze o počáteční optické denzitě 0,1. Bylo zjištěno, že kolíčky víčka mikrotitrační destičky, které má naše laboratoř k dispozici, jsou pro formaci biofilmu nevhodné. Dále tedy probíhalo měření pouze v jamičkách. V Experimentu 2 bylo kategorizováno 25 stafylokokových klinických izolátů do skupin dle schopnosti produkovat biofilm za podmínek vybraných v Experimentu 1. Deset z nich bylo zařazeno do kategorie „Středně silný producent“ nebo „Silný producent“ biofilmů.

Závěry: S použitím známých producentů biofilmu je možné vybrat nejvhodnější podmínky k jeho formaci. Určité klinické izoláty stafylokoků jsou schopny za těchto podmínek formovat detekovatelnou biofilmovou masu, na níž je možné testovat účinnost kandidátních antimikrobních látek. Tyto kmeny lze označit za středně silné až silné biofilmové producenty.

Klíčová slova: Model „*Calgary Biofilm Device*“, hodnocení anti-biofilm aktivity, biofilm formující mikroorganismy, bakteriální rezistence vs. biofilm

2. ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Study program: Healthcare Bioanalytics

Author: Bc. Adéla Diepoltová

Supervisor: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Title of thesis: Optimization of the method for sensitivity evaluation of biofilm-forming staphylococci against candidate antimicrobial compounds

Background: The aim of this thesis was to optimize approach for *in vitro* formation of staphylococcal biofilms on the pegs and on the wells of the 96-well panel as an analogous approach to commercially available Calgary Biofilm Device system. The aim of the Experiment 1 was to evaluate incubation conditions (such as impact of a growth medium, incubation mode, optical density of the starting bacterial inoculum and type of surface) leading to maximal biofilm formation of two biofilm producer strains with unknown biofilm phenotype and one staphylococcal strain known as strong biofilm producer. The most advisable conditions were used in incubation process of Experiment 2. This work should propose the approach leading to *in vitro* formation of the most voluminous staphylococcal biofilms exploitable for candidate drug antimicrobial activity testing.

Methods: Spectrophotometric measurement of the crystal violet colour extracted from wells with fixed and stained *Staphylococci* to evaluate the ability to form biofilm.

Main findings: The ability of three staphylococcal strains to form biofilm was affirmed. Soyabean medium supplemented with pig plasma, incubation with shaking and starting bacterial inoculum with optical density of 0,1 were evaluated as the most convenient conditions. In Experiment 2 staphylococcal clinical isolates were categorised according to the ability to form biofilm in conditions chosen in Experiment 1. 10 out of 25 isolates were recognised to be “Moderate biofilm producers” or “Strong biofilm producers”.

Conclusions: Using verified biofilm producers, it is possible to find the most convenient conditions for biofilm formation. Certain staphylococcal clinical isolates are capable to form biofilm voluminous enough for valid antimicrobial candidate compounds testing These isolates were categorised as moderate or strong biofilm producers.

Key words: Calgary Biofilm Device, anti-biofilm activity evaluation, biofilm-forming microorganisms, bacterial resistance vs. biofilm

3. SEZNAM ZKRATEK

Aap	<u>A</u> ccumulation <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein, protein sdružený s akumulací
AHSL	<u>N</u> - <u>A</u> cy <u>l</u> - <u>H</u> om <u>o</u> serine <u>L</u> actone, N-acyl-homoserin lakton
AIDS	<u>A</u> cquired <u>I</u> mmune <u>D</u> eficiency <u>S</u> yndrom, syndrom získaného selhání imunity
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection, Americká sbírka mikroorganismů
ATB	<u>A</u> nt <u>i</u> biotic, antibiotikum
ATBs	<u>A</u> nt <u>i</u> biotics, antibiotika
CCM	<u>C</u> zech <u>C</u> ollection of <u>M</u> icroorganisms, Česká sbírka mikroorganismů
CDC	The <u>C</u> enter for <u>D</u> isease <u>C</u> ontrol, centrum pro kontrolu onemocnění
CLSM	<u>C</u> onfocal <u>L</u> aser <u>S</u> canning <u>M</u> icroscopy, konfokální laserová skenovací mikroskopie
CONS	<u>C</u> oagulase- <u>N</u> egative <u>S</u> taphylococci, koaguláza negativní stafylokoky
CRBSI	<u>C</u> atheter- <u>R</u> elated <u>B</u> lood <u>s</u> tream <u>I</u> nfection, infekce cévního řečiště spojená s užitím kateru
DMMB	1,9- <u>d</u> imethyl <u>m</u> ethylene <u>b</u> lue, 1,9-dimethyl methylenová modř
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPM	<u>E</u> xtracellular <u>P</u> olymeric <u>M</u> atrix, extracelulární polymerní matrice
EPS	<u>E</u> xopolysaccharides, exopolysacharidy

FBS	<u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum, fetální hovězí sérum
FDA	<u>F</u> luorescein <u>D</u> iacetate, fluorescein diacetát
MIC	<u>M</u> inimal <u>I</u> nhibitory <u>C</u> oncentration, minimální inhibiční koncentrace
MHA	<u>M</u> ueller- <u>H</u> inton <u>A</u> gar, Mueller-Hinton agar
MRSA	<u>M</u> ethicilin- <u>R</u> esistant <u>S.</u> <u>a</u> ureus, <i>methicilin-rezistentní S. aureus</i>
MSCRAMMs	<u>M</u> icrobial <u>S</u> urface <u>C</u> omponents <u>R</u> ecognizing <u>A</u> dhesive <u>M</u> atrix <u>M</u> olecules, mikrobiální povrchové struktury rozpoznávající adhezivní molekuly matrice
OD	<u>O</u> ptical <u>D</u> ensity, optická denzita
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline, Pufrovaný fyziologický roztok
PI	<u>P</u> ropidium <u>I</u> odide, propidium jodid
PIA	<u>P</u> olysaccharide <u>I</u> ntercellular <u>A</u> dhesin, polysacharidový mezibuněčný adhesin
PP	<u>P</u> ig <u>P</u> lasma, prasečí plazma
SA	<u>S</u> taphylococcus <u>a</u> ureus, <u>S.</u> <u>a</u> ureus
SE	<u>S</u> taphylococcus <u>e</u> pidermidis, <i>S. epidermidis</i>
TCBD	<u>T</u> he <u>C</u> algary <u>B</u> iofilm <u>D</u> evice, destička a víčko s kolíčky pro formování biofilmu
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)- -2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide, 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)- 2H-tetrazolium-5-karboxanilid)

4. ÚVOD

Ožehavým otázkám problematiky biofilmů v současnosti čelí znalci mnoha oborů. Tyto houževnaté vrstvy mikroorganismů a jejich produktů znesnadňují průmyslovou výrobu – kontaminují výrobní linky, znehodnocují vybavení či komplikují technologické postupy. Lékařům, farmaceutům, mikrobiologům a dalším odborníkům lékařského prostředí znesnadňují proces léčby infekčně nemocného pacienta. Biofilmy se totiž v rámci patogeneze určitých infekčních onemocnění formují na lidských tkáních, implantátech, katetrech a dalších zdravotnických nástrojích. Hlavní hrozbou biofilmů osídlujících lidský organismus je jejich odolnost. Odstranění těchto biomas je totiž mimořádně náročné. Mikroorganismy v biofilmech často nereagují na antimikrobiální léčbu, zdravotníci se musí obvykle přiklonit k riskantnímu chirurgickému řešení. Je tedy zřejmé, že se celý proces terapie a rekonvalescence infekčních onemocnění sdružených s tvorbou biofilmů výrazně prodlužuje a je rovněž finančně náročnější.

Mezi nejčastější původce s biofilmem spojených infekcí řadíme stafylokoky. Jsou běžně izolovány například ze stěrů infikovaných ran, tkání a kontaminovaných lékařských pomůcek.

Aby bylo možné navrhnout nové přístupy vedoucí k eliminaci stafylokokových biofilmů, je naprosto nezbytné je nejprve detailně poznat. Studium procesu formace biofilmu, jeho architektury a zejména mechanismů rezistence je proto zcela stěžejním vodítkem.

Jeden z možných přístupů, které mohou vést k celkové eliminaci či k potlačení dalšího rozrůstání biofilmů v živých organismech, spočívá v terapii antimikrobními látkami. Jak je zmíněno výše, mikrobiální biofilmy jsou také velkou výzvou pro řadu pracovišť, jejichž náplní je vývoj nových antiinfektiv. Nově syntetizované sloučeniny jsou, mimo jiné, podrobovány testům, vedoucím k odhalení případné anti-biofilmové aktivity.

Biofilmy lze nechat řízeně vznikat *in vitro*, což je pro zkoušky citlivosti velmi výhodné. Je však potřeba dosáhnout takových podmínek, aby byl biofilm schopen narůst do rozměrů vhodných pro průkazné provedení testů. Přístupů k testování citlivosti bakterií v biofilmech bylo již zavedeno několik. Na výzkumu nových antiinfektiv se rovněž podílí mikrobiologická sekce Katedry biologických

a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

Cílem této práce bylo navrhnout takové kultivační podmínky pro formování stafylokokových biofilmů *in vitro*, které vykazují analogické atributy biofilmů, které jsou tvořeny *in vivo*. Součástí této práce bylo, pomocí zavedené metody, prokázat biofilmový fenotyp u klinických izolátů bakterie rodu *Staphylococcus* získaných z Ústavu klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové. U těchto izolátů se počítá s jejich využitím pro pokročilé studie interakcí kandidátní antiinfektivum vs. bakterie.

5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Teoretická část

Bakteriální biofilm a jeho role v rezistenci bakterií vůči antimikrobním látkám. Přehled metod vedoucích k hodnocení aktivity kandidátních antimikrobních látek na biofilm formující mikroorganismy.

Experimentální část

Optimalizace metodiky vedoucí k formaci biofilmu u bakterie *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*. Určení biofilmového fenotypu sbírkových kmenů bakterií rodu *Staphylococcus*.

6. TEORETICKÁ ČÁST

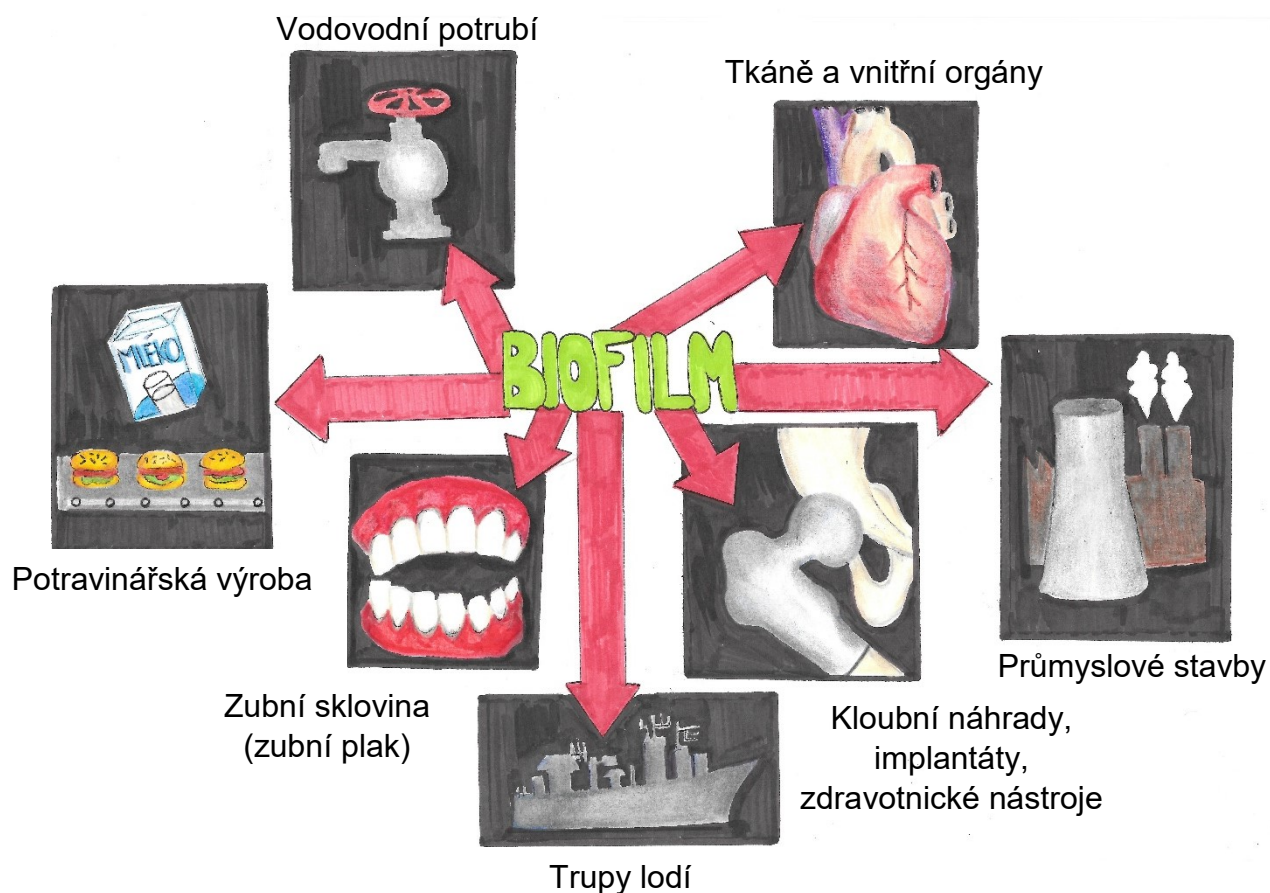
6.1. BIOFILMY

Biofilmy jsou definovány jako mikrobiální společenstva obklopená vlastními produkty, jenž vytváří slizovitý obal – polysacharidovou matici (=matrix). Buňky biofilmu jsou přisedlé k sobě navzájem a/nebo pevně upoutané k povrchu (Costerton *et al.*, 1995). Biofilmy mohou vytvářet bakterie, kvasinky, houby, prvoci i drobné mnohobuněčné organismy za předpokladu, že jsou schopny pevně přilnout k substrátu (Rulík *et al.*, 2011).

Sesilní (přisedlé) mikrobiální buňky se od buněk flotujících (tzv. planktonních) v mnohém liší, a to již na genové úrovni. Změny se potom projeví odlišným fenotypem (Berlanga *et Guerrero*, 2016).

Život v biofilmu je pro mikroby velmi výhodný hned z několika hledisek. Přítomnost velkého počtu organismů blízko u sebe přináší snadnější mezibuněčnou komunikaci. Matrix buňkám pomáhá transportovat živiny, vytváří stálé prostředí a poskytuje ochranu proti toxinům, záření a také proti antimikrobním látkám (Lhotský, 2015).

Složení matrix koresponduje s místem výskytu biofilmu a s druhy přítomných mikrobů. Kromě polysacharidů, nukleových kyselin, lipidů, nutrientů a enzymů (proteázy, β -laktamázy) obsahuje matrice nebuněčné materiály např. minerální krystaly, částice jílu či bláta, korozní partikule nebo třeba složky krve. Z toho vyplývá, že biofilm je schopný přilnout na velice rozličné povrchy. Může se jednat o potrubní systémy, kanalizace, živé tkáně, zdravotnické implantáty a nástroje (Obrázek 1). Biofilmy vytvořené v organismu jsou pro hostitele velikou hrozbou. Stojí často za velmi závažnými, chronickými rezistentními infekcemi (Donlan, 2002).



Obrázek 1: Místa iritovaná nežádoucí formací biofilmu (A. Diepoltová, 2018)

6.1.1. Vznik a vývoj biofilmu

Proces formace biofilmu se zejména na molekulární úrovni liší dle jeho mikrobiálního složení. Práce nabízí obecný pohled na celý proces vývoje a stručně se soustředí na charakteristiky stafylokokového biofilmu.

6.1.1.1. Adheze

Biofilm se formuje v několika krocích. Prvním z nich je adheze planktonických buněk k substrátu. Jedná se o zcela stěžejní fázi celého procesu. Kolonizace probíhá s výhodou na hrubších površích z důvodu přítomnosti

rozsáhlejší třecí plochy a minimálních smykových sil. V řadě studií bylo prokázáno, že bakterie snáze přilnou k povrchům hydrofobním a nepolárním (např. teflon, plast...). Mezi buňkou a povrchem tedy nejčastěji dochází k hydrofobním interakcím. Naopak méně vhodné jsou substráty hladké a hydrofilní (např. kovy, sklo...) (Fletcher *et al.*, 1979). K adhezi také přispívá okolní médium proudící kolem povrchu. Látky obsažené v této tekutině chemicky modifikují substrát, čímž kolonizaci podporují (Donlan, 2002).

Další faktory ovlivňující adhezi jsou pH, obsah živin v médiu, jeho iontová síla a teplota. Důležitá je také schopnost mikroorganismu adaptovat se na vnější faktory změnou fenotypu. Z flotující buňky se stává buňka sesilní, což je podpořeno změnou exprese až 1/3 původních proteinů. Kolonizaci substrátu usnadňuje přítomnost bičků, fimbrií a adhezínů – proteinových či polysacharidových molekul, jež jsou exprimovány na povrchu mikrobu. Dále se zvýšeně exprimují proteiny tvořící matrici, póry, ale také proteiny účastnící se přenosu živin složitým systémem společenstva (Schindler, 2008).

Stafylokoky nemají k dispozici pili či fimbrie. Při adhezi k pevnému podkladu se tedy musí spolehnout především na interakce vlastních proteinů s živým či neživým povrchem. Exprimují proto komponenty označované jako MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*), které jsou schopné vázat se na lidské proteiny, jako je fibrinogen či fibronectin. Například *S. aureus* exprimuje na svém povrchu tzv. vázanou koagulázu (*clumping factor A a B, ClfA, ClfB*), která díky interakci s fibrinogenem sráží lidskou krevní plazmu. Jiným příkladem stafylokokového proteinu, který sehrává klíčovou úlohu při adhesi, je „*collagen adhesion protein*“, který se, jak už jeho název napovídá, váže na kolagen ve tkáni pacienta a podmiňuje tímto infekce pojivových tkání. Další skupinou stafylokokových proteinů, které jsou schopné zprostředkovávat adhezi, jsou autolyziny – enzymy katalyzující buněčnou smrt. Tyto proteiny se účastní vazby mezi jednotlivými bakteriálními buňkami a stejně tak přispívají k vazbě bakteriálních buněk k živým a neživým podkladům (Marraffini *et al.*, 2006; Otto, 2008).

6.1.1.2. Maturace

Proces maturace biofilmu je dělen do dvou fází. V první z nich dochází k agregaci bakteriálních buněk, jež je umožněná přítomností adhezivních proteinů či exopolysacharidů (EPS). Ve druhé fázi se vytvořená masa remodeluje, čímž vzniká charakteristická houbovitá architektura biofilmu (Otto, 2008).

Nejdůležitější substancí podporující mezibuněčnou adhezi stafylokoků je tzv. PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*), po chemické stránce N-acetylglukosamin, který společně s kyselinou teichoovou, molekulami extracelulárních nukleových kyselin a proteiny vytváří matrix biofilmu, obvykle nazývanou pojmem sliz (Arciola et al., 2015).

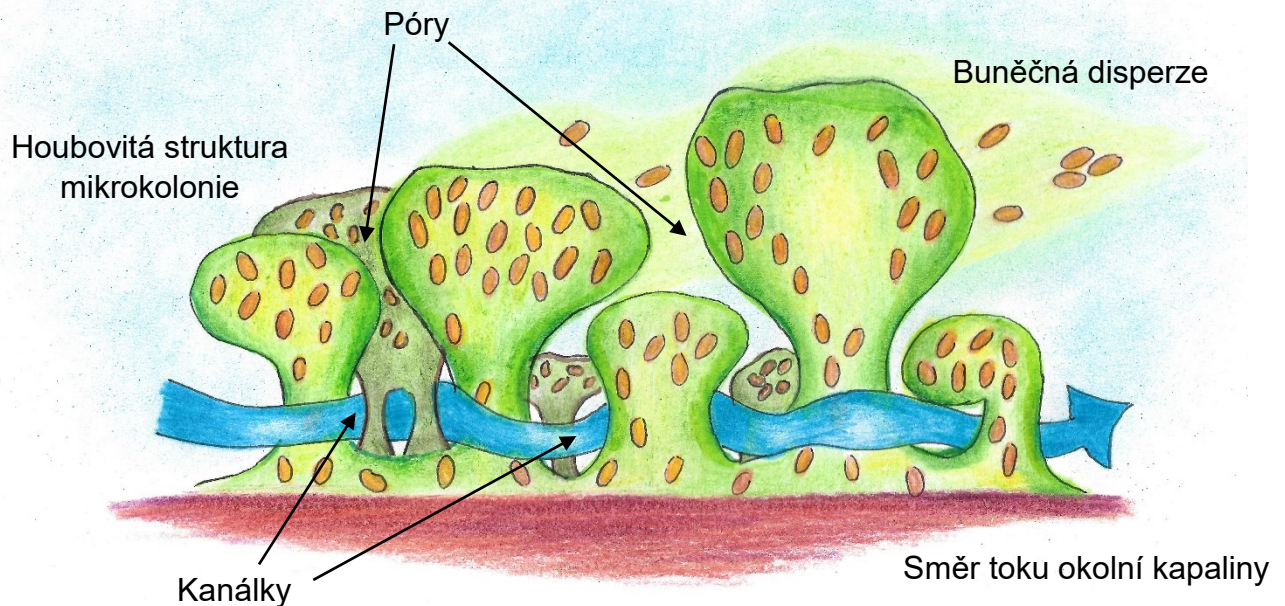
Jednotky PIA jsou částečně deacylované. Ve vodném prostředí tedy vykazují pozitivní náboj, což je stěžejní pro agregaci negativně nabitých buněčných povrchů. PIA funguje jako jejich pojídlo. Geny kódující substanci PIA jsou organnizovány v *ica* operonu (*intracellular adhesion operon*, operon mezibuněčné adheze). *Ica* lokus byl později nalezen u několika kmenů bakterie *S. aureus*, kde byla mezi ním a schopností formovat biofilm prokázána spojitost (Sadovskaya et al., 2005).

Produkce PIA molekul však není pro formaci biofilmu nezbytná. Jejich roli mohou zastoupit adhesivní proteiny. Důležitou substancí v biofilmech nezávislých na PIA je Aap (Accumulation associated protein, protein sdružený s akumulací). AAp byl poprvé pozorován u bakterie *Staphylococcus epidermidis* jako adhesin potřebný k agregaci buněk na skleněných či polystyrenových površích (Hussain et al., 1997).

6.1.1.3. Architektura biofilmu

Mikrokolonie buněk a jejich výměšky z EPS vytváří houbovitě struktury, mezi nimiž se proplétají kanálky, které na povrchu filmu tvoří póry. Těmi jsou do nitra komplexu přiváděny živiny a kyslík z okolního média (Obrázek 2). Vrstva

biofilmu může v závislosti na druhovém složení a prostředí kolísat od několika jednotek po stovky mikrometrů (Donlan, 2002).



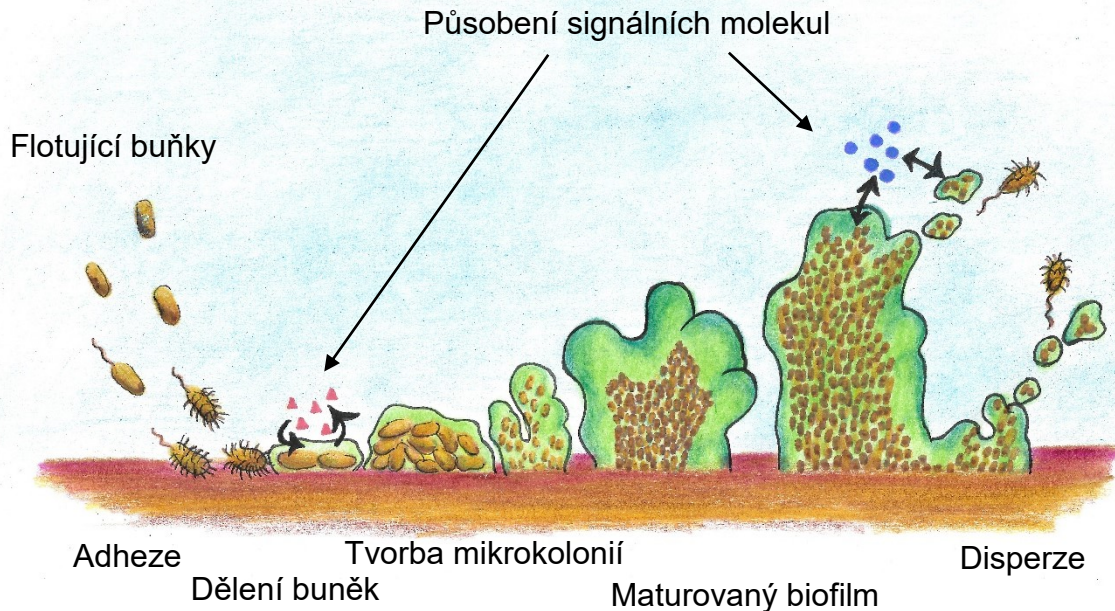
Obrázek 2: Architektura biofilmu (A. Diepoltová, 2019)

6.1.1.4. Disperze

Zralý biofilm je pozměňován okolní proudící kapalinou, která přisedlé buňky „odlupuje“. Tento proces disperze má pro biofilm velký klinický význam. Uvolněné buňky osidlují nové niky organismu, čímž dochází k rozšíření infekce v těle hostitele. Míra a rychlost disperze závisí na:

- Rychlosti průtoku okolní kapaliny (např. rychlosti krve proudící kolonizovanou cévou).
- Dostupnosti nutrientů a stavebního materiálu biofilm (EPS).
- Přítomnosti enzymů rozkládajících matrix (často shodné s proteiny formace biofilmu) (Otto, 2008).

Vývoj biofilmu je shrnut v Obrázku 3.



Obrázek 3: Proces formace a disperze biofilmu (A. Diepoltová, 2018)

6.1.2. „Quorum sensing“

Vývoj stafylokokového biofilmu je závislý na regulačním komunikačním principu označovaném „*quorum sensing*“. Podstatnou vlastností buněk biofilmu je schopnost sledovat hustotu vlastní populace a reagovat na její růst pomocí vlastních chemických signálů. Se zvyšující se denzitou biofilmu signál roste a je tím snáze detekovatelný pro sousední buňky. Po dosažení kritické koncentrace (bod „*quorum*“) buněčná replikace ustane a biofilm tak nemůže být přehuštěn. Systém *quorum sensing* rovněž zajistí snížení produkce adhezních proteinů, a naopak zvýší expresi mnohých virulentních faktorů. Zjednodušeně řečeno, *quorum sensing* přepíná buňky biofilmu z režimu adheze na stacionární režim (Yarwood *et* Schliever, 2003).

6.1.3. Rezistence biofilmu k antimikrobním látkám

Jak už bylo zmíněno, biofilmy vznikají v rámci patogeneze infekčního onemocnění na lidských tkáních a na nejrůznějších zdravotnických náhradách a pomůckách jako jsou katetry, kloubní náhrady nebo třeba dioptrické čočky. Proces terapie těchto infekcí však významně komplikuje fakt, že jsou mikroorganismy usídlené v biofilmu velice často rezistentní k antimikrobním látkám. Infekcí spojených s přítomností biofilmu se lze zpravidla velice těžko zbavit. Jedinou možností léčby bývá chirurgický zákrok či vyjmutí kolonizovaného předmětu z těla pacienta, což prodlužuje dobu rekonvalescence a zvyšuje cenu léčby (Lebeaux *et al.*, 2014).

Mikrobiální rezistence je definována jako schopnost mikroorganismů množit se i při působení zvýšené koncentrace antimikrobních látek. Zjednodušeně řečeno platí, že kmeny s vyšší MIC (*minimum inhibitory concentration*, minimální inhibiční koncentrace) vykazují vyšší rezistenci. Podle tohoto konvenčního kritéria by však buňky tvořící biofilm zvýšenou rezistenci nevykazovaly. Až na výjimky, buňky v biofilmu nerostou lépe v přítomnosti většiny antimikrobních látek než buňky volně flotující. Rezistence biofilmového společenstva spočívá především ve schopnosti působení antimikrobních látek ve vyšších koncentracích přežít. Lze tedy říci, že mikroby, sdružené do komplexní struktury biofilmu, vykazují neporovnatelně vyšší rezistenci vůči látkám, které mají cidní účinek (Lewis, 2001). Tuto „relativní“ rezistenci hodnotí některé zdroje jako sto až tisícinásobně vyšší oproti rezistenci flotujících buněk (Gilbert *et al.*, 2002).

6.1.3.1. Mechanismy rezistence

Schopnost antibiotik inhibovat růst biofilmu dokazuje, že jsou látky schopné vrstvou matrice difundovat, i když se postupně naředují. Jak je tedy možné, že buňky nezemřou (Lewis, 2001; Lhotský, 2015)?

Předpokladů k tomuto typu rezistence je několik. Přítomnost nabitých hydratovaných EPS kolem jednotlivých buněk a mikrokolonií biofilmu omezuje přístup rozpuštěných látek z okolního média podle principu iontových interakcí a molekulárního síta.

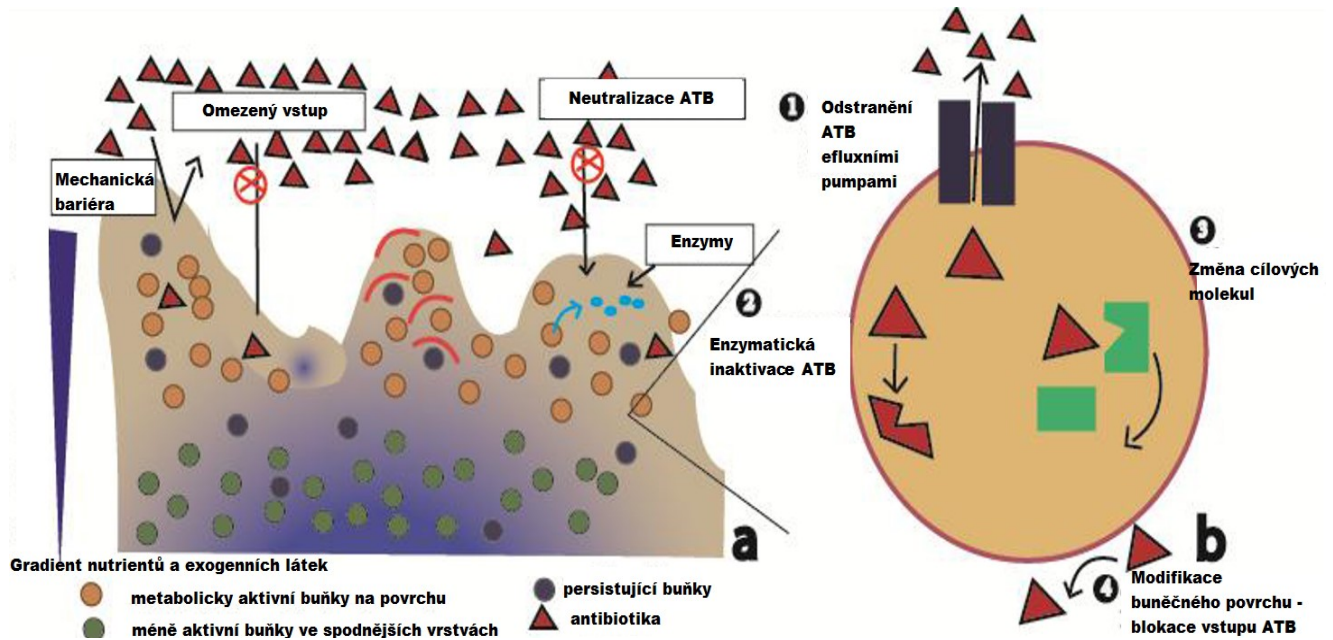
Alternativní ochranou je chemická či enzymatická aktivita složek matrice, díky níž mohou být aktivní molekuly neutralizovány (Gilbert *et al.*, 2002). Matrix některých bakterií například obsahuje extracelulární enzymy β -laktamázy. Tyto enzymy hydrolyzují amidovou vazbu ve struktuře β -laktámového kruhu antibiotika, čímž ho inaktivují. Dále může matrice obsahovat proteázy či sacharázy (Bonnet, 2004; Gilbert *et al.*, 2002).

Buňky biofilmu také oplývají rozdílným fenotypem (Gilbert *et al.*, 2002). Rezistenci například podporují efluxní pumpy – MRPs („*Multidrug resistance pumps*“). Podávání subletálních dávek ATBs (*antibiotics*, antibiotika) může vést k expanzi mutovaných buněk, které tyto pumpy exprimují. Pumpy tvoří systém tří peptidů, díky němuž jsou z buňky vyloučeny veškeré neznámé chemické sloučeniny (Brooun *et al.*, 2000).

Maturací v biofilmu přibývá perzistentních buněk ve stavu dormance (= „spánku“). Takové buňky mají zpomalený metabolismus, nedělí se a jejich mechanismus programované buněčné smrti je deaktivovaný. Dormantní buňky přečkají období působení ATBs bez výrazné úhony, a když nebezpečí pomine, schopnost dělení se obnoví a je iniciována tvorba nových kolonií (Lebeaux *et al.*, 2014).

Dalším faktorem, který k rezistenci přispívá, je skutečnost, že biofilmy, především na živých površích, bývají tzv. vícedruhové, tedy tvořené vícero druhy mikroorganismů. Například biofilm tvořící zubní plak obsahuje více než 500 bakteriálních druhů (Mah *et al.*, 2001). Experiment na dvoudruhovém biofilmu tvořeném bakterií *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis* ukázal, že činnost genů kódujících faktory rezistence proti ATB erythromycinu, oxacilinu a tobramycinu byla výrazně zvýšena ve srovnání s jednodruhovým biofilmem ať tvořeným *S. aureus* či *S. epidermidis*. (Vandecandelaere, I. *et al.*, 2017).

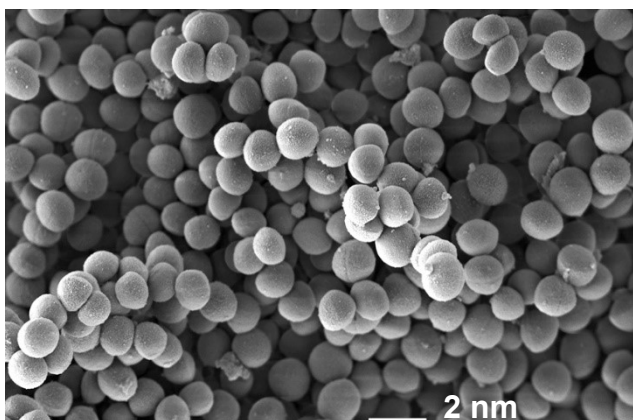
Mechanismy rezistence se uplatňují v různých kombinacích, čímž se jejich efekt násobí. Základní mechanismy rezistence biofilmu jsou vyobrazeny na Obrázku 4. Procesy rezistence jsou opět regulovány komunikačním systémem *quorum sensing* (kapitola 6.1.2.).



Obrázek 4: Základní mechanismy rezistence buněk biofilmu.
Převzato z Kirmosaoglu, 2016 a upraveno

6.2. BIOFILMY TVOŘENÉ STAFYLOKOKY

Stafylokoky jsou v průměru asi 1 μ m velké Gram pozitivní, nepohyblivé, nesporulující a většinou neopouzřené sférické bakterie (Obrázek 5). Vyskytují se jednotlivě, ve dvojicích či v nepravidelných shlucích. Od streptokoků jsou rozeznatelné pozitivním katalázovým testem. To znamená, že při kontaktu kolonie s peroxidem vodíku lze pozorovat vznikající bublinky kyslíku. Snadno kultivovatelné, fakultativně anaerobní stafylokoky rostou na živném médiu v okrouhlých lesklých koloniích o průměru cca 1-3 mm (Obrázek 6).



Obrázek 5 VLEVO: Snímek bakterie *Staphylococcus aureus* pořízený rastrovacím elektronovým mikroskopem (N. Bannert, K. Madela, 2014)

Obrázek 6 VPRAVO: *Staphylococcus aureus* (nažloutlé kolonie), *Staphylococcus epidermidis* (bílé kolonie) na Mueller-Hinton agaru (A. Diepoltová, 2018)

Stafylokoky jsou nejčastějšími původci infekcí, které doprovází výskyt biofilmu v lidském organismu. Toto prvenství však souvisí s prostým faktem. Běžně se totiž vyskytují jako komenzálové na lidské kůži či sliznicích. Koaguláza negativní *S. epidermidis* je nejčastěji izolovaným nozokomiálním patogenem na jednotkách intenzivní péče. Extrémně vysoké procento těchto izolátů vykazuje rezistenci na ATB methicilin. Stafylokoky vykazují mechanismy nespecifické rezistence, která se, na rozdíl od rezistence specifické, nezakládá na genetické informaci kódované na chromozomu či plazmidu. Pro biofilmy je právě nespecifická rezistence charakteristická (Otto, 2008).

Zmíněný oportunní patogen *S. epidermidis* způsobuje infekce zejména u osob se sníženou funkcí imunity (nedonošení novorozenci, osoby trpící onemocněním AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome, syndrom získaného selhání imunity) nebo pacienti podstupující imunosupresivní léčbu). U jinak zdravých pacientů vyvolá onemocnění pouze v případě, že se mu podaří proniknout skrze slizniční či kožní bariéru narušenou poraněním, chirurgickým zákrokem, zavedením lékařského nástroje apod. Léčba takových infekcí je často náročná a zdlouhavá. Infekce způsobené stafylokoky jsou popsány v kapitole 6.3. (Arber *et al.*, 1994).

Koaguláza pozitivní *S. aureus* kolonizuje dočasně či trvale pouze část dospělé populace. S biofilmem spojené infekce, které způsobuje, jsou podobné

jako v případě původce *S. epidermidis*. Mají ale často komplikovanější průběh, neodpovídají na léčbu antibiotiky a pacient musí v mnoha případech podstoupit riskantní chirurgický zákrok (Otto, 2008).

Nechvalně známým strašákem nemocničního prostředí je *S. aureus* označovaný jako MRSA, tedy *methicilin-rezistentní S. aureus*. MRSA vyvolává těžko léčitelné nozokomiální infekce vyžadující speciální opatření zajišťující izolaci pacienta, individualizaci jeho léčby a hygieny a podléhá hlášení (Pantosti et Venditti, 2009).

Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí (*European Centre for Disease Prevention and Control*) udává, že v roce 2017 bylo v rámci Evropské unie izolováno průměrně 16,9 % MRSA kmenů. Výsledky odpovídají významnému poklesu výskytu rezistentní bakterie. Až třetina evropských zemí tento klesající trend potvrdila. Středisko však i nadále upozorňuje na hrozící riziko a pokládá bakterii *S. aureus* za stále velmi významného původce infekcí vykazujících vysokou morbiditu a mortalitu. Za dosavadním úspěchem v boji s MRSA stojí bezesporu důmyslná epidemiologická opatření jednotlivých zemí a ústavů (ECDC, 2017).

S biofilmem související infekce způsobené jinými stafylokoky mají mírnější průběh a nejsou příliš časté. Většinou opět souvisí s porušením imunitních bariér pacienta (Otto, 2008).

6.3. INFEKCE SPOJENÉ S VÝSKYTEM BIOFILMU

Je odhadováno, že přes 65 % lidských infekcí souvisí s přítomností biofilmu. Obecně lze shrnout, že přítomnost biofilmu stav onemocnění výrazně komplikuje, prodlužuje pacientovu rekonvalescenci a výrazně zvyšuje náklady na léčbu (Gbejuade, 2015). Příklady infekcí spojovaných s výskytem stafylokokového biofilmu jsou popsány níže.

6.3.1. Infekční endokarditida

Formaci biofilmu na vnitřní straně srdce, endokardu, předchází poničení této tkáně. K deformaci může dojít mechanickou cestou (přímým poraněním, turbulentním proudem krve způsobeným srdečními abnormalitami atd.) nebo zánětem. Snadno kolonizovatelné jsou zejména poškozené srdeční chlopně. Odhalením subendotelových vrstev dojde ke stimulaci vyplavení fibrinu a krevních destiček, které podporují adhezi bakterií (Tong, 2015).

Bakterie k jinak sterilnímu srdci doputují hematogenní cestou z primárního stanoviště. Tím bývá typicky ústní dutina po stomatologickém zákroku. Původce infekce bývají v tomto případě nejčastěji streptokoky (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans* apod.) (Habib et al., 2009).

Autoři recentních článků však upozorňují, že 16 % až 34 % infekčních endokarditid je zapříčiněno bakterií *S. aureus*. Tento typ infekčního onemocnění je spojován s častým výskytem rezistence k antimikrobním látkám a vysokou mortalitou (Tong, 2015).

Mezi příznaky infekční endokarditidy se řadí horečka nejasného původu, pozitivní mikrobiologické vyšetření krve, změny na echokardiogramu a cévní projevy (krvácivá kožní ložiska na dlaních a ploskách, krvácení do spojivek a nehtových lůžek či nitrolební krvácení) (IKEM).

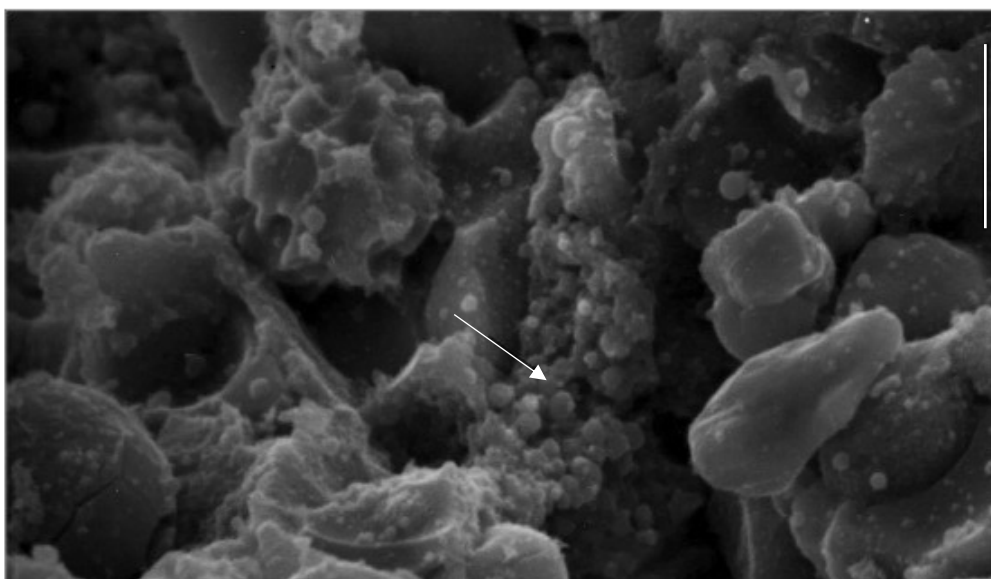
K terapii onemocnění se využívá vysokých dávek nitrožilních antibiotik. V případě neúspěšné antibiotické léčby, při srdečním selhání či při vysokém riziku embolizace se přistupuje k chirurgické remodelaci či náhradě postižené chlopně (IKEM).

6.3.2. Osteomyelitida

Osteomyelitida je zánětlivé onemocnění zasahující kosti. Nejčastějším původcem choroby je *S. aureus*, který se k povrchu kostí přesune přímo či hematogenní cestou z místa chirurgického zákroku, traumatu či jiné nesouvisející infekce. Hematogenní typ infekce obvykle postihuje konce dlouhých kostí dětí a

axiální části kostry dospělých pacientů (Archer *et al.* 2011, Tong, 2015).

Krví se patogen pohybuje v planktonické fázi růstu, pro snadnou adhezi však již tehdy exprimuje velké množství adhezivních molekul vázajících molekuly jako je fibrinogen, fibrin, kolagen či elastin. Po přisednutí prvních buněk na povrch kosti začíná jejich množení a produkce extracelulární matrix (Obrázek 7), ta tkáň deformuje, čímž usnadňuje adhezi dalším a dalším buňkám. Houževnatý biofilm z kostí dospělých pacientů je často nutné odstranit chirurgicky. Juvenilní osteomyelitidu dětí je možné léčit vysokými dávkami antibiotik (Archer *et al.*, 2011).



Obrázek 5: Fotografie z rastrovacího elektronového mikroskopu. Koky adheované k povrchu kosti. Šipka směřuje na polysacharidový materiál (biofilmovou matrix). Úsečka odpovídá 5 μm
Převzato a upraveno z Archer *et al.*, 2011

6.3.3. Infekce očí

Tvorba biofilmu limituje použití a vzhled očních čoček, zátek slzných kanálků (tzv. plugů), stentů slzných cest či očních implantátů. Mimo abiotický materiál bývá biofilm rovněž pozorován na kapsuli oční čočky a stromatu rohovky. Takové nálezy odpovídají různě závažným očním infekcím (Bispo *et al.*, 2015).

Keratitis je infekce rohovky, která může, jako neléčená, vyústit až ve ztrátu zraku. Největším predispozičním faktorem onemocnění je v současnosti používání kontaktních čoček. Incidence onemocnění je ovlivněna typem materiálu čoček, jejich hygienou a také délkou a četností jejich nošení. Ukázalo

se, že pravidelné nošení čoček pozměňuje epitel rohovky, čímž usnadňuje adhezi bakterií, a naopak omezuje přirozenou omývací schopnost oka. Častými původci keratitidy jsou Gram negativní *Pseudomonas aeruginosa* a *Serratia* spp. a Gram pozitivní *S. aureus* a jiné stafylokoky. Neobvyklý však není ani mykologický nález (Bispo *et al.*, 2015).

Endoftalmitida je vzácný, ale závažný zánět vnitřních struktur oka. Původci většiny těchto infekcí jsou exogenní. Do nitra očí jsou zavlečeny chirurgickým zásahem, poraněním nebo jako rozšíření rohovkové infekce. Operaci katarakty komplikuje akutní endoftalmitida ze 70% vyvolaná bakterií *S. epidermidis*. 10% onemocnění vyvolá *S. aureus*, 5% jiné Gram pozitivní koky a 6% Gram negativní tyčky. K upřesnění diagnózy se kultivuje aspirát oka nebo se provádí molekulární metody. Antibiotická léčba se podává injekčně přímo do oka hned po odběru aspirátu. Další možností terapie je poměrně riskantní zákrok – vitrektomie, tedy odstranění části sklivcové tkáně (Durand, 2013).

6.3.4. Infekce ran

Metody využívající rastrovací elektronovou mikroskopii a molekulární metody potvrdily, že zevní rány pacientů mohou být kolonizovány bakteriemi. Nejčastěji kultivovaný *S. aureus*, jakožto oportunní patogen, musí pro vyvolání infekce překonat kožní bariéru pacienta. Cestu stafylokům otevírají chirurgické zákroky či poranění. K adhezi na tkáně využívají adhesivních proteinů (např. fibronektin-vázajícího proteinu atd.). Bakteriální kolonizace výrazně komplikuje a prodlužuje hojení ran (Neopane *et al.*, 2018).

Skupina vědců pozorovala schopnost formace biofilmu u 150 stafylokokových izolátů získaných stěrem z rány pacientů. Přibližně u 67 % izolátů byla tato schopnost potvrzena. 86,7 % biofilm formujících kmenů vykazovala multirezistenci (Neopane *et al.*, 2018).

Stafylokokové biofilmy často vznikají také na chronických ranách, jako jsou vředy z důsledku diabetu (diabetická noha), dekubitů či venózních bércových vředů (Neopane *et al.*, 2018).

Stav známý jako diabetická noha vzniká jako důsledek neuropatie asociované s onemocněním diabetes mellitus. Pacient si nepovšimne drobné

ranky na dolní končetině, která, neléčená, hnisá a ulceruje. Konečným stádiem je nekrotizace tkáně, jež je povětšinou řešena amputací postižené končetiny (Peters *et al.*, 2012).

Výzkumem autorů A. Banu *et al.* bylo v ranách diabetiků prokázáno 82 mikrobiálních druhů. Nejčastěji pozorovanými byly *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiella oxytoca* a *Proteus sp.* 43 % vzorků vykazovalo přítomnost biofilmů, zejména stafylokokových (Banu *et al.*, 2015).

6.3.5. Infekce z kontaminace lékařských nástrojů

6.3.5.1. Kontaminace cévních katetrů

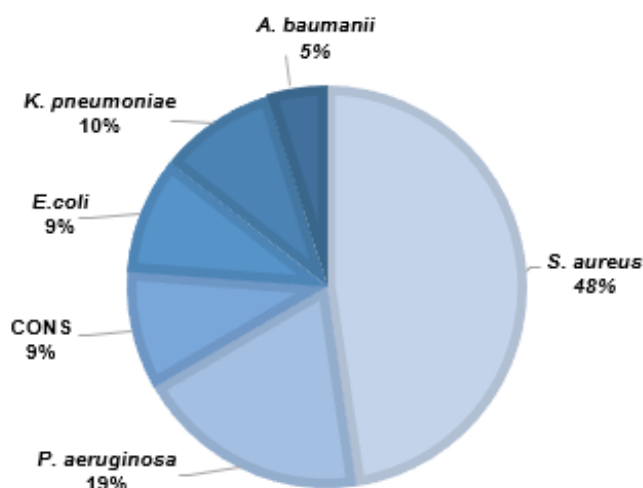
CRBSI (Catheter-Related Bloodstream Infection) neboli infekce cévního řečiště spojená s užitím katetru je definována jako bakterémie pocházející z žilního katetru. Pokud je z hemokultury i katetru pacienta kultivován stejný bakteriální kmen, hovoříme o CRB (Catheter-Related Bacteremia, s katetrem spojená bakterémie). Pokud je hemokultura na přítomnost tohoto kmene negativní nebo se hemokultivace neprovedla, charakterizujeme onemocnění jako CRS (Catheter-Related Sepsis, s katetrem spojená sepse) (Křiklava *et Ševčík*, 2008).

Použití žilních katetrů představuje pro pacienta jisté infekční riziko. Zejména na jednotkách intenzivní péče je však zatím cévní katetrizace naprosto nevyhnutelná. Zavedený katetr umožňuje podávání léků, tekutin, krevních derivátů apod. Zároveň je díky němu možné monitorovat hemodynamické funkce krve pacienta (Gahlot *et al.*, 2014).

Infekce periferního žilního katetru nejsou časté, jejich komplikace však mohou být velmi závažné. Větší nebezpečí pro pacienta však skýtá kontaminace centrálního žilního katetru. V porovnání s užitím periferního katetru je riziko CRBSI až 64x větší. Urgentní stavy pacienta mnohdy donutí lékaře odklonit se od zdlouhavé aseptické inserce pomůcky. Kontaminace zejména nemocničními kmeny a rozvoj infekce tak probíhá velice rychle a může být fatální (Jirouš, 2012).

Nejčastější bakteriální druhy působící CRBSI jsou *S. aureus*, *P.*

aeruginosa, koaguláza negativní stafylokoky (= CONS, Coagulase-Negative Staphylococci), *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Acinetobacter baumannii*. Procentuálnímu zastoupení původců onemocnění odpovídá Graf č. 1. V poslední době se však mikrobiální spektrum původců onemocnění přesouvá ke kvasinkám, konkrétně k non-albicans kmenům (Gahlot *et al.*, 2014).



Graf 1: Procentuální zastoupení bakterií, jakožto původců onemocnění CRBSI. Převzato a upraveno z Gahlot *et al.*, 2014.

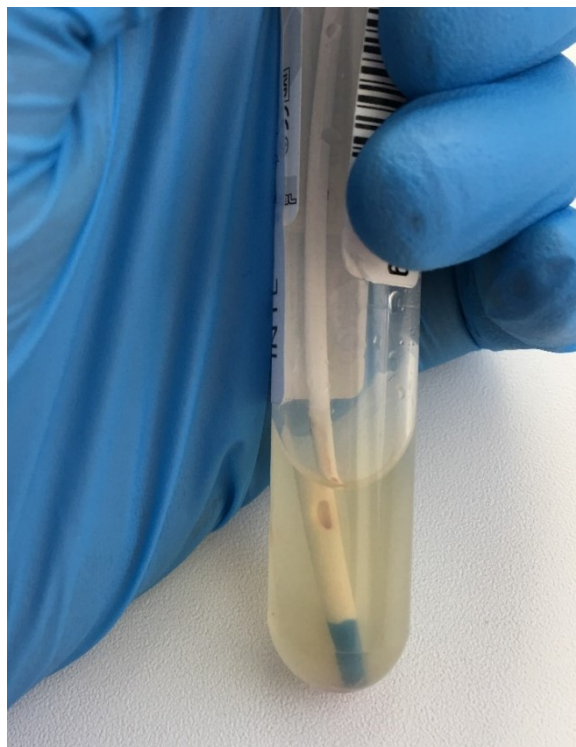
Kontaminace nejčastěji probíhá extraluminálně vlivem migrace patogenů podél vnějšího povrchu katetru. Méně častý je intraluminární rozsev infekce krevní cestou z jiného místa organismu – většinou z urinálního traktu (8,3% – 16,2%), abdominálních infekcí (5,5% – 16%), dolních cest dýchacích (13,4% – 15%) či z infekce v místě chirurgického výkonu (4,4% – 13,4%). Další možností je užití kontaminovaných roztoků, pomůcek a přímá kontaminace rukama zdravotníků (Jirouš, 2012).

Incidence CRBSI se liší nemocnice od nemocnice. Záleží například na typu užívaných katetrů. Teflonové katetry vykazují nižší riziko kolonizace než ty z PVC. Zároveň platí, že čím delší katetr je použit, tím pravděpodobnější je jeho osídlení patogeny. Dlouhodobě zavedený katetr je rovněž kontaminován spíše než ten, který je použit krátkodobě. Rozvoj a závažnost onemocnění závisí na

celkovém stavu pacienta a na přítomnosti komorbidit. Riziková jsou dialyzovaní či hyperglykemičtí pacienti. V neposlední řadě je třeba vybrat vhodné místo k zavedení katetru, tedy místo s nejmenší denzitou kožní mikroflóry. Z tohoto hlediska je nejvhodnější inserce katetru do podklíčkové žíly. Nejméně vhodná aplikace je do žíly femorální (Gahlot *et al.*, 2014; Jirouš, 2012).

Klinické příznaky CRBSI jsou nespecifické. Často se objevuje zarudnutí a ztuhlost v místě aplikace katetru, horečka, chvění a nauzea. Komplikace jsou však závažné: endokarditida, septická artritida či osteomyelitida (Tong *et al.*, 2015).

Odběry krve pro mikrobiologické vyšetření se provádí přímo z katetru a z periferního řečiště mimo katetr ještě před podáním antibiotik. Vhodné je také provést kultivaci samotného katetru po jeho vyjmutí. Jeho úsek se přímo zalévá do kultivačního média tak, jak je vyfotografováno na Obrázku 8 (Jirouš, 2012).



Obrázek 6: Fotografie cévního katetru zalitého v kultivačním bujónu. Fotografie pořízena se svolením Lenky Syrové – vrchní laborantky Oddělení infekční diagnostiky Litomyšlské nemocnice

Preventivní opatření vůči CRBSI jsou poměrně jednoduchá. Patří k nim správné mytí a dezinfekce rukou zdravotníků, jejich informovanost a správné zacházení při aplikaci s katetry. Důležité je uchovávat katetrizační techniku

v aseptickém stavu, stejně tak místo inserce by mělo být správně vydezinfikované. Samozřejmostí by měla být neustálá kontrola stavu pacienta.

6.3.5.2. Kontaminace močových katetrů

Močový katetr je v současnosti nepostradatelným pomocníkem při péči o pacienty s rozličnými diagnózami. Jeho stavba je velice jednoduchá. Zatímco některé typy tvoří pouze jedna rovná či mírně zahnutá trubička, Foleyův katetr sestává z dvou kanálů – první pro odtok moči a druhý sloužící k plnění balonku na jeho konci. Funkcí balonku je udržet celý nástroj na svém místě (Feneley *et al.*, 2015).

Důvodů vedoucích k použití močového katetru je několik:

- Usnadňuje odtok moči u pacientů s dysfunkcí močového měchýře.
- Řeší komplikace spojené s inkontinencí (např. kožní infekce) u pacientů se ztrátou kognitivních funkcí či pacientů v terminálním stádiu onemocnění.
- Slouží k podání chemoterapeutik.
- Pomáhá s odtokem moči při/po operaci močového traktu či při porodu.
- Umožňuje provést urodynamické testy.

Správně zavedený katetr by měl bez poškození setrvat na místě až 12 týdnů. Močové katetry jsou vyrobené z latexu či lépe nealergenního silikonu potaženého hydrofilní vrstvou zabraňující formaci biofilmu (Feneley *et al.*, 2015).

Stafylokoky nejsou častými původci běžných infekcí močového traktu. Nové epidemiologické výzkumy však upozorňují na četnost výskytu stafylokoků podílejících se na specifických infekcích močového systému, např. u těhotných žen, dlouhodobě hospitalizovaných či diabetických pacientů, pacientů trpících nádorovým onemocněním, u osob s ledvinovými kameny nebo právě u katetrizovaných pacientů (Walker *et al.*, 2017).

Proces vzniku biofilmu na katetru je podpořen kondicionací nástroje

vrstvou organických molekul pocházejících z močového traktu pacienta. Na takto upraveném povrchu dochází k adhezi bakteriálních buněk, pro které je katetr, spojující jinak sterilní močový měchýř s hustě osídleným perineem, jednoduchou cestou vstupu. Kondicionující molekuly se objevují v rámci zánětlivého procesu jako reakce na zásah do organismu, tedy z důvodu zavedení nástroje. Například agregace buněk bakterie MRSA, vyvolaná přítomností pacientova fibrinogenu, pokračuje vznikem celých bakteriálních shluků a po dosažení dostatečné hustoty společenstva dojde k up-regulaci jeho virulenčních faktorů nezbytných pro přežití a rozšiřování kolonií (Trautner *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2017).

Množení bakterií podporuje také stáza moči v močovém měchýři či přímo v katetru. To vede ke zvětšování celého biofilmu, který může kanál nástroje dokonce ucpat a způsobit tím mechanické či ischemické porušení sliznice močového měchýře (Trautner *et al.*, 2004).

Pro kultivaci patogenu se vytažený katetr zalévá do tekutého kultivačního média (Obrázek 9).



Obrázek 7: Fotografie močového katetru připraveného k inkubaci patogenu zalitím kultivačním bujónem. Fotografie pořízena se svolením Lenky Syrové – vrchní laborantky Oddělení infekční diagnostiky Litomyšlské nemocnice

Léčba stafylokokových, s katetrem spojených infekcí, je velice náročná. Velké procento stafylokokových původců totiž vykazuje rezistenci proti methicilinu. Komplikace u tohoto typu infekce nejsou ojedinělé a mohou končit i fatálně (Trautner *et al.*, 2004).

6.3.5.3. Kontaminace kloubního implantátu

Materiály užívané v ortopedických náhradách (titan, chirurgická ocel, kobalt-chrom, polymethylmethakrylát či rozličné biopolymery) mohou podléhat kolonizaci bakteriálním biofilmem. Infekční ložiska pozorovaná na kloubních implantátech bývají kategorizována do tří skupin:

- Časná infekce (rozvoj do 3 měsíců po operaci)
 - obvykle zapříčiněná virulentními kmeny *S. aureus* či *E.coli*.
- Infekce s opožděným nástupem (rozvoj po 3-24 měsících od operace)
 - vyvolaná často méně virulentními kmeny (např. koaguláza negativními stafylokoky).
- Pozdní infekce (rozvoj po 2 letech od operace)
 - způsobená virulentními kmeny *S.aureus*, streptokoky a Gram negativními tyčkami (Gbejuade *et al.*, 2015).

Infekce časná a opožděná jsou většinou důsledkem kontaminace při operaci a provází je jak lokální, tak systémové symptomy. Díky laboratorním markerům, jako je C-reaktivní protein nebo počet bílých krvinek, lze také prokázat probíhající zánět v organismu (Gbejuade *et al.*, 2015).

Pozdní infekce jsou povětšinou asymptomatické a rozsev infekce probíhá hematogenně z místa nesouvisející infekce měkké tkáně či močového, dýchacího či gastrointestinálního traktu (Ainscow *et Denham*, 1984).

Mezi ovlivnitelné rizikové faktory infekce vyvolané kolonizací kloubní náhrady patří hyperglykémie, obezita, kouření nebo třeba přítomnost bakterie *S. aureus* v nosní mikroflóře. Neovlivnitelnými faktory jsou nedostatečná činnost jater, ledvin nebo imunitního systému. Odstranění či optimalizace zmíněných faktorů pomáhá v prevenci proti onemocnění. Především hrozbě onemocnění je rovněž možné dodržet antiseptického operačního protokolu – zkrácením délky anestezie, udržet pacientovy normotermie či správnou dezinfekcí kůže. Důležitou strategií je také podávání profylaxe před operací (Alijanipour *et al.*, 2014).

Novým přístupem v předoperační profylaxi jsou vakcíny. Ty jsou však

většinou cíleny na konkrétní antigeny buněk v planktonické fázi. Komplexnost a heterogenita biofilmů vývoj efektivních vakcín komplikují (Gbejuade *et al.*, 2015).

Zajímavým způsobem předcházení vzniku biofilmu na implantátu je možnost *coatingu* (=úprava nanesením určité vrstvy) jeho plochy. Kloubní náhrady se potáhnou vrstvou hydratovaného polyethylen glykolu či polyethylen oxidu, která bakteriální adhezi omezuje. Stejný efekt by měla mít chemická modifikace povrchu zinkem. Tzv. aktivní *coating* spočívá v povrchové úpravě kloubní náhrady antibiotiky (Gbejuade *et al.*, 2015).

6.4. IN VITRO BIOFILMOVÉ MODELY

Zjednodušené biofilmové modely formované *in vitro* jsou užitečným nástrojem, díky nimž je možné získat odpovědi na otázky týkající se procesu formace biofilmu, fyziologie a architektury. Modely *in vitro* nabízí mnohé výhody. Patří k nim nižší cena, jednoduchá manipulace a aplikovatelnost v rámci „*high throughput*“ metod (Lebeaux *et al.*, 2013).

Souhrnnou tabulku všech v současnosti používaných *in vitro* biofilmových modelů přehledně zkompletoval ve své práci Lebeaux *et al.*, 2013. Zjednodušeně se tyto modely dají rozdělit do 3 základních skupin – modely uzavřené, otevřené a tzv. modely mikrokosmu neboli zjednodušené modely experimentálního mikrobiálního ekosystému (Lebeaux *et al.*, 2013).

6.4.1. Uzavřené *in vitro* biofilmové modely

Biofilmy v uzavřeném neboli statickém modelu jsou limitovány obsahem nutrientů a vhodným zavzdušněním. K uzavřeným modelům se řadí ty nejúspěšnější a nejčastěji používané, jako je model kolonie na agaru (colony model) nebo model v mikrotitrační destičce či na kolíčkách (The Calgary Biofilm Device). Biofilmová masa formovaná v uzavřeném modelu je poměrně jednoduše kvantifikovatelná s využitím barvení (např. krystalovou violetí). Ke kvantifikaci živých metabolicky aktivních buněk biomasy slouží například metoda založená

na redukcí (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilidu (= XTT) (Lebeaux *et al.*, 2013).

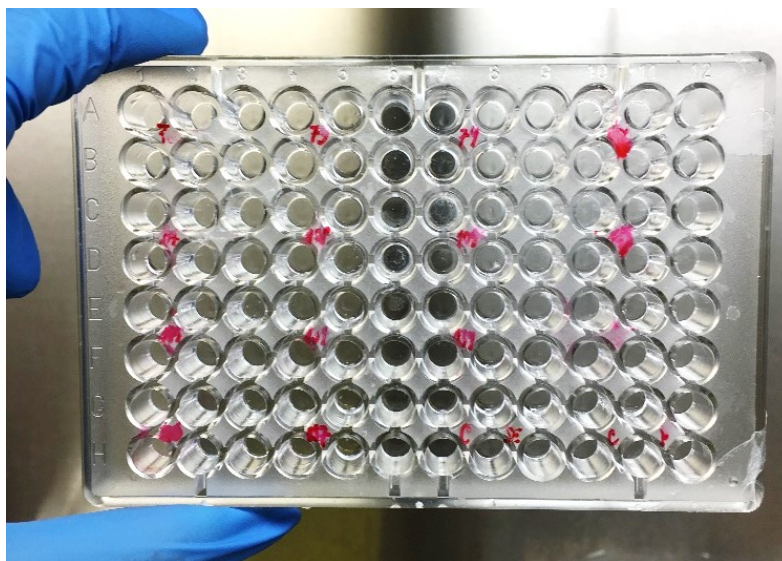
Nejčastěji využívané uzavřené *in vitro* modely jsou stručně popsány níže.

6.4.1.1. Model biofilmu kolonie na agaru

Kolonie pozorovaného mikroorganismu jsou kultivovány na agaru. Model dovoluje studium základních charakteristik biofilmu – struktury, gradientu chemických látek v biomase a chování mikroorganismů. Model vyniká svou jednoduchostí a lze jej využít k testům citlivosti na antimikrobní látky (Zuroff *et al.*, 2010).

6.4.1.2. Model biofilmu v mikrotitrační destičce

Řízená formace biofilmu v jamičkách je jednoduchou, často využívanou metodou. Buňky jsou adherovány na stěnách a dnech 96 jamkové destičky (Obrázek 10). Úspěch modelu je zajištěn jeho nízkou cenou, využitelností v rámci „*high throughput*“ metod a díky širokému uplatnění. Je ideální ke sledování chování mikrobů v rámci biofilmu, ke studiu citlivosti biofilm formujících mikroorganismů na antimikrobní látky (Niu *et Gilbert*, 2004).

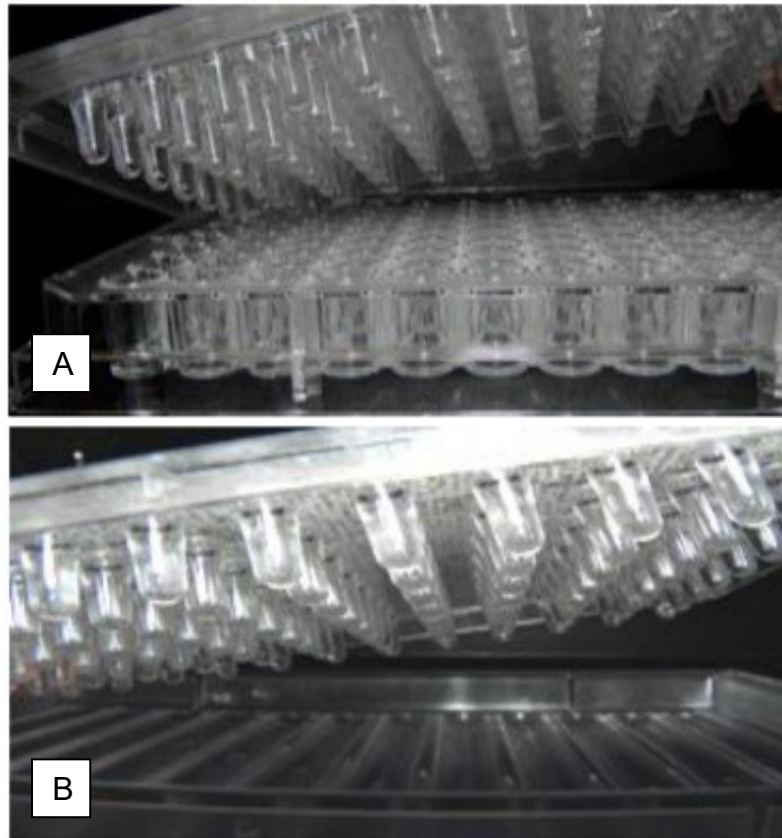


Obrázek 8: Fotografie mikrotitrační destičky. V jamkách je pozorovatelný mléčný povlak – fixovaný biofilm před obarvením (A. Diepoltová, 2019)

6.4.1.3. The Calgary Biofilm Device

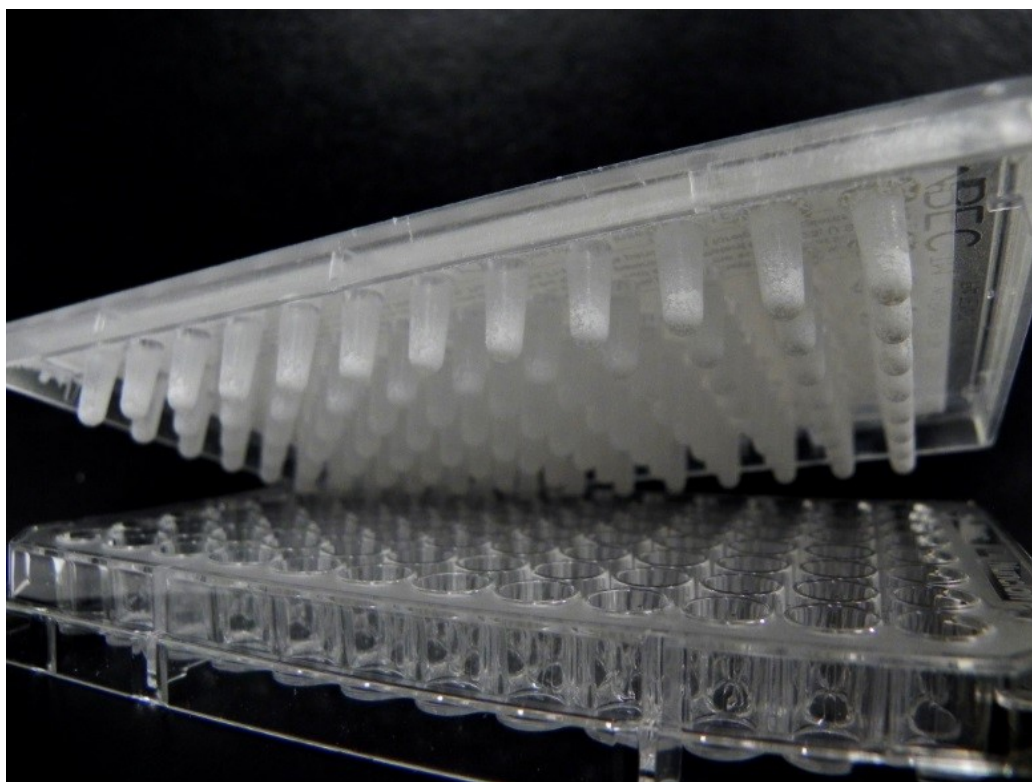
The Calgary Biofilm Device (TCBD) je screeningová „*high throughput*“ metoda sloužící ke zjištění účinnosti antimikrobních látek působících proti biofilmu, stanovení míry rezistence biofilmu, sledování vývoje biofilmu v čase nebo například k pozorování synergických interakcí antimikrobních látek. Nástrojem pro provedení metody je plastová 96 jamková destička s polystyrenovým víčkem o stejném počtu kolíčků. Do jamek je pipetována suspenze mikroorganismu. Mikroby adherují na povrch kolíčků a jamek a za přítomnosti kmitavého pohybu vytváří zralý biofilm. Růst biofilmu může být omezován různými podmínkami (Innovatech, Inc, 2019; Ceri *et al.*, 1999).

Systém TCBD nabízí dvě varianty (Obrázek 11). V první jsou jamičky zcela oddělené. Destičku je tedy možné využít pro formaci biofilmů tvořených odlišnými mikrobiálními druhy tak, aby nedošlo ke kontaminaci. Druhá varianta sestává z propojených žlábků. Pipetování do nich je jednodušší, může ale obsahovat pouze biofilm jediného kmene (Innovatech, Inc, 2019).



Obrázek 9: Dvě varianty modelového systému TCBD. A: Destička s 96 jamkami, B: Destička s kanálky. Převzato z Innovatech, Inc, 2019

Společnost Innovatech nabízí také systém s upravenými kolíčky. Povrchy kolíčků jsou kondicionovány materiály, které usnadňují adhezi buněk (tzv. „*coating*“). Může se jednat o úpravu hydroxyapatitem, poly-L-lysinem, celulózou či kolagenem. Fotografie takto upravených kolíčků k nahlédnutí níže (Obrázek 12) (Innovatech, Inc, 2019).



Obrázek 10: Kolíčky systému TCBD upravené hydroxyapatitem.
Převzato z Innovatech, Inc, 2019

6.4.2. Otevřené *in vitro* modely

Otevřené neboli dynamické systémy jsou technicky náročnější a vyžadují specializované náčiní. Nespornou výhodou těchto metod je možnost ovlivnění podmínek okolního prostředí, např. smykových sil. Dynamické systémy umožňují kontinuální výměnu odpadních látek, metabolických meziproduktů a odumřelých buněk za čerstvé médium (Lebeaux *et al.*, 2013). Vybrané otevřené *in vitro* modely jsou krátce popsány níže.

6.4.2.1. Průtoková komora

Model průtokové komory umožňuje růst biofilmu bez přítomnosti planktonických buněk, které jsou odplaveny proudem. S použitím fluorescenční mikroskopie lze sledovat růst, strukturu a fyziologii biofilmu v čase (Cruzs *et al.*, 2012).

Čerstvé médium je do systému vháněno ze zásobníku peristaltickou pumpou a pokračuje až do průtokové cely. Do cely jsou zanořeny kolíčky se vsazenými disky, na jejichž povrchu dochází k adhezi buněk (Cruzs *et al.*, 2012). Metoda vyobrazena pomocí Schématu 1.

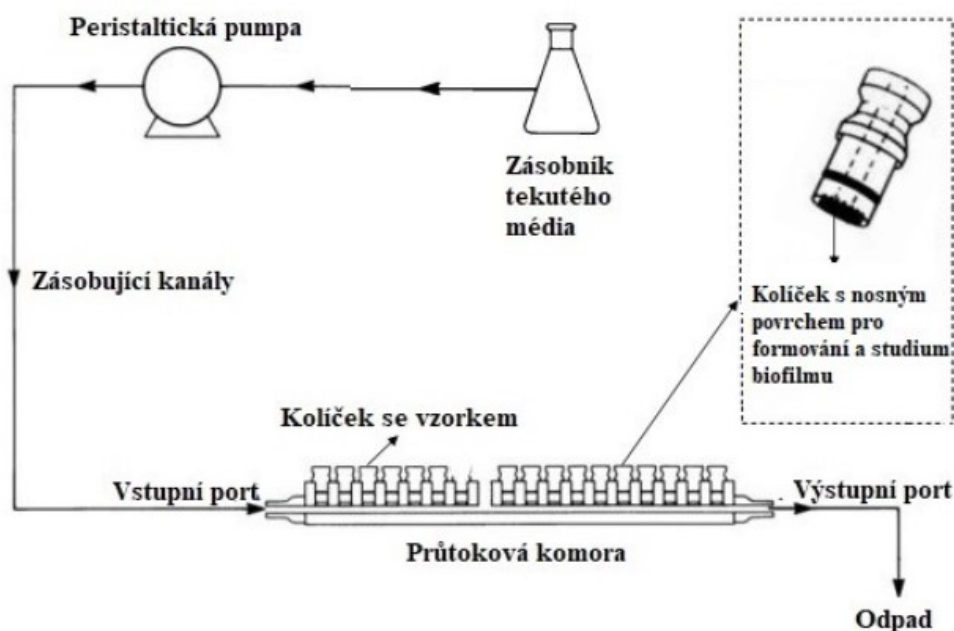
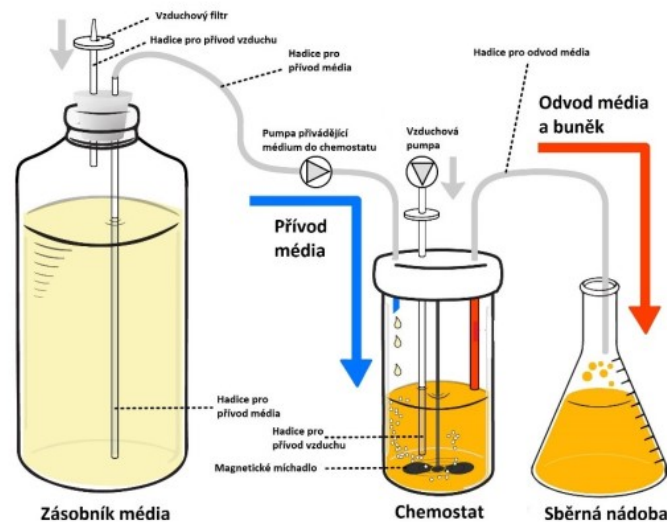


Schéma 1: Schéma průtokové komory. Převzato z Bailey, 2011.
Upravila Roubalová, 2018

6.4.2.2. Chemostat

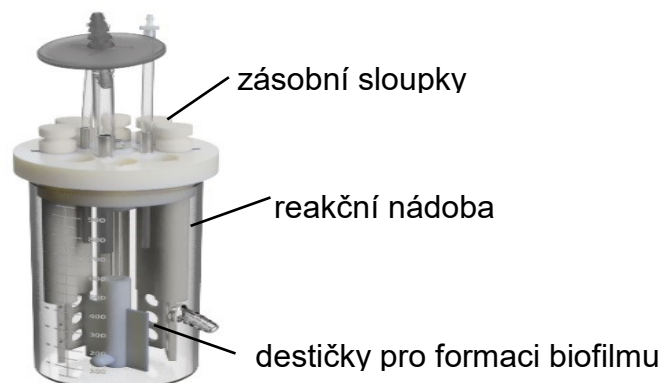
Chemostat (Obrázek 13) je, zjednodušeně řečeno, nádobou s přístupem čerstvého média a odtokem pro odpadní látky, usmrcené buňky atd. Soustava zajišťuje vhodné prostředí pro buněčné dělení a konstantní hustotu populace (Dykhuizen *et Hartl*, 1983).



Obrázek 11: Princip chemostatu. Převzato z Gresham et Hong, 2014, *The functional basis of adaptive evolution in chemostats*. Upravila Roubalová, 2018

6.4.2.3. CDC biofilmový reaktor

CDC (= *The Center for Disease Control*) reaktor se skládá z osmi nosníků. Každý z nich drží 3 disky (tzv. kupóny) s adherovaným biofilmem. Celý systém je ponořen do skleněné nádoby o objemu 1 l, ve které cirkuluje kultivační médium (Obrázek 14). Kupóny je poté možné z reaktoru vyjmout pro účely testů citlivosti na antimikrobní látky. Biofilm může být od kupónu sonicky oddělen a dále studován či pozorován mikroskopicky (BioSurface Technologies Corporation, 2019).



Obrázek 12: CDC biofilm reaktor (Převzato z BioSurface Technologies Corporation, 2019 a upraveno)

6.4.3. Modely experimentálního mikrokosmu

Modely mikrokosmu (z ang. „*microcosms*“ = mikroskopický ekosystém) jsou sofistikované komplexní heterogenní modely blíže napodobující *in vivo* podmínky. Systémy často zahrnují několik bakteriálních druhů a využívají materiálů získaných z pozorovaného prostředí. Například při modelování dentálních biofilmů se užívá hydroxyapatit a sliny nebo se za účelem mimikování situace *in vivo* abiotické povrchy pokrývají lidskými buňkami (Lebeaux *et al.*, 2013).

Střední cestou mezi *in vitro* a *in vivo* modely jsou tzv. *ex vivo*. modely Biofilmy jsou formovány na tkáňových a orgánových řezech, nejčastěji prasečích nebo myších. Tkáňové řezy jsou následně umístěny a kultivovány v systému *in vitro*. Biofilmy je možné studovat také *in vivo* na savčích či jiných modelových organismech (Lebeaux *et al.*, 2013).

6.5. VIZUALIZACE BIOFILMŮ

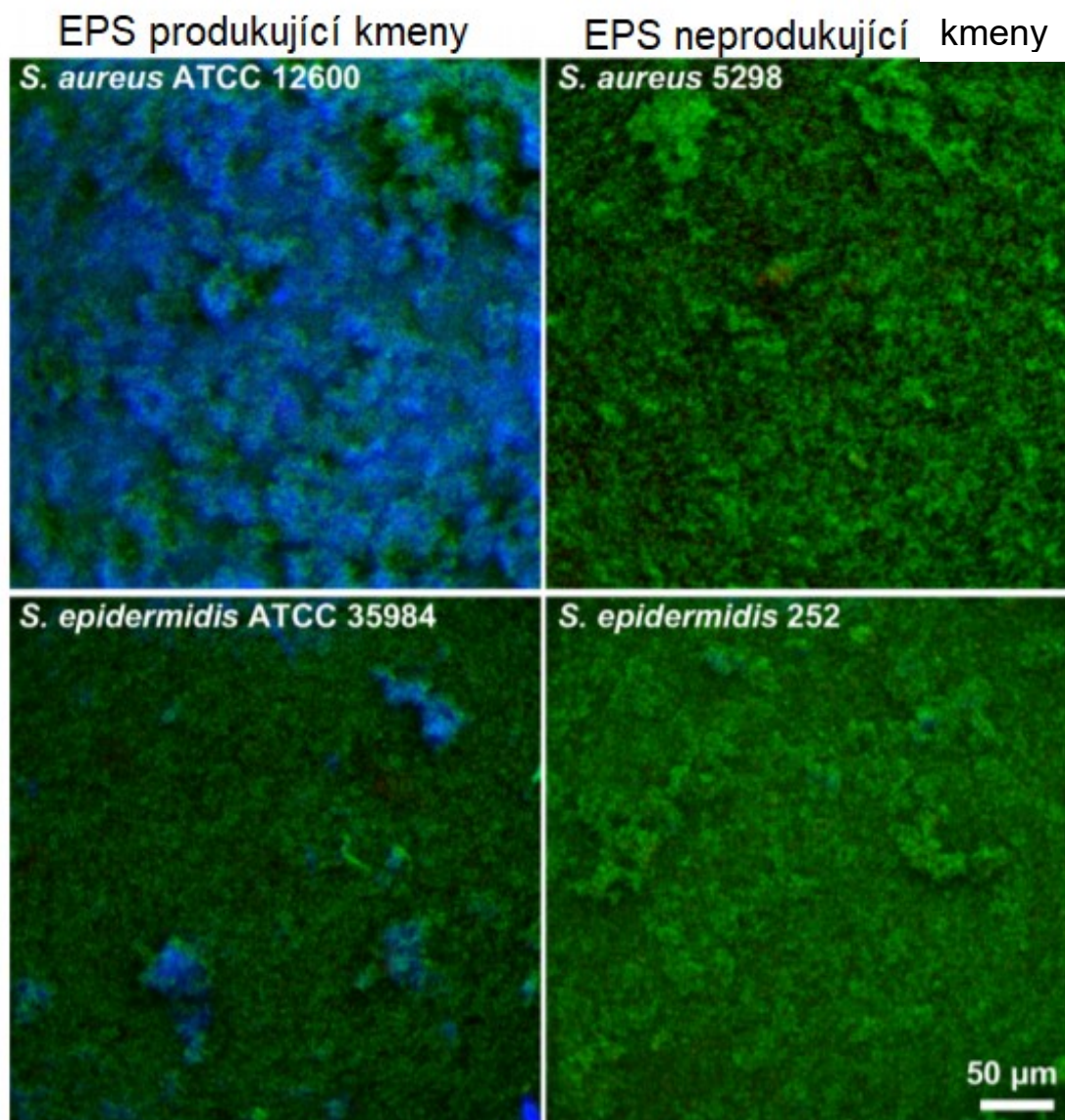
6.5.1. Konfokální laserová skenovací mikroskopie

Ke studiu architektury a morfologie biofilmu se využívá konfokální laserová skenovací mikroskopie (CLSM, confocal laser scanning microscopy). Laser osvětluje preparát ve zvolené hloubce přes bodovou konfokální clonu. Odražené světlo nebo emitované fluorescenční záření se poté vrací stejným objektivem. Bodová clona detektoru odfiltruje světlo z nepožadovaných rovin (Chen, 2004).

Složením dvojrozměrných obrazů na sebe navazujících rovin lze získat trojrozměrnou vizualizaci. Tento typ mikroskopie je tedy možné využít mimo jiné pro neinvazivní zobrazení dějů probíhajících uvnitř živých buněk (Chen, 2004).

K vizualizaci biofilmů se využívá fluoroforů. Fluorofor je molekula absorbující světlo, která pohlcenou energii vyzáří ve formě fluorescenčního záření (Ragazzi *et al.*, 2013).

Jedním z fluoroforů, které lze využít pro vizualizaci polysacharidové struktury je kalkofluorová běloba. Na Obrázku 15 níže zvýrazňuje kalkofluorová běloba matrix právě se formujícího stafylokového biofilmu (Guspaniar *et al.*, 2017).



Obrázek 13: Snímky pořízené prostřednictvím konfokálního laserového skenovacího mikroskopu. Bakteriální buňky barvené kitem LIVE/DEAD™. Exopolysacharidy matrice (EPS) obarvené kalkofluorovou bělobou. Převzato a upraveno z Guspaniar *et al.*, 2017

6.5.2. Kvantifikace biofilmů

Metody kvantifikace biofilmů lze rozdělit do tří základních skupin:

- kvantifikace biomasy (objem biofilmu včetně matrix i buněk),
- kvantifikace pouze živých buněk,
- kvantifikace objemu matrix (Peeters *et al.*, 2008).

6.5.2.1. Kvantifikace biomasy

6.5.2.1.1. Barvení krystalovou violetí

Barvivo krystalová violet se váže na negativně nabitě povrchy buňky i na polysacharidy matrix, takže zvýrazňuje veškerý obsah jamky při použití mikrotitrační destičky. Barvivo je dále v jamkách extrahováno a jeho intenzita je stanovována spektrofotometricky. Krystalová violet je vhodným nástrojem pro potřebu sledování formace biofilmu – například při sledování vlivu vnějších podmínek (Li *et al.*, 2013).

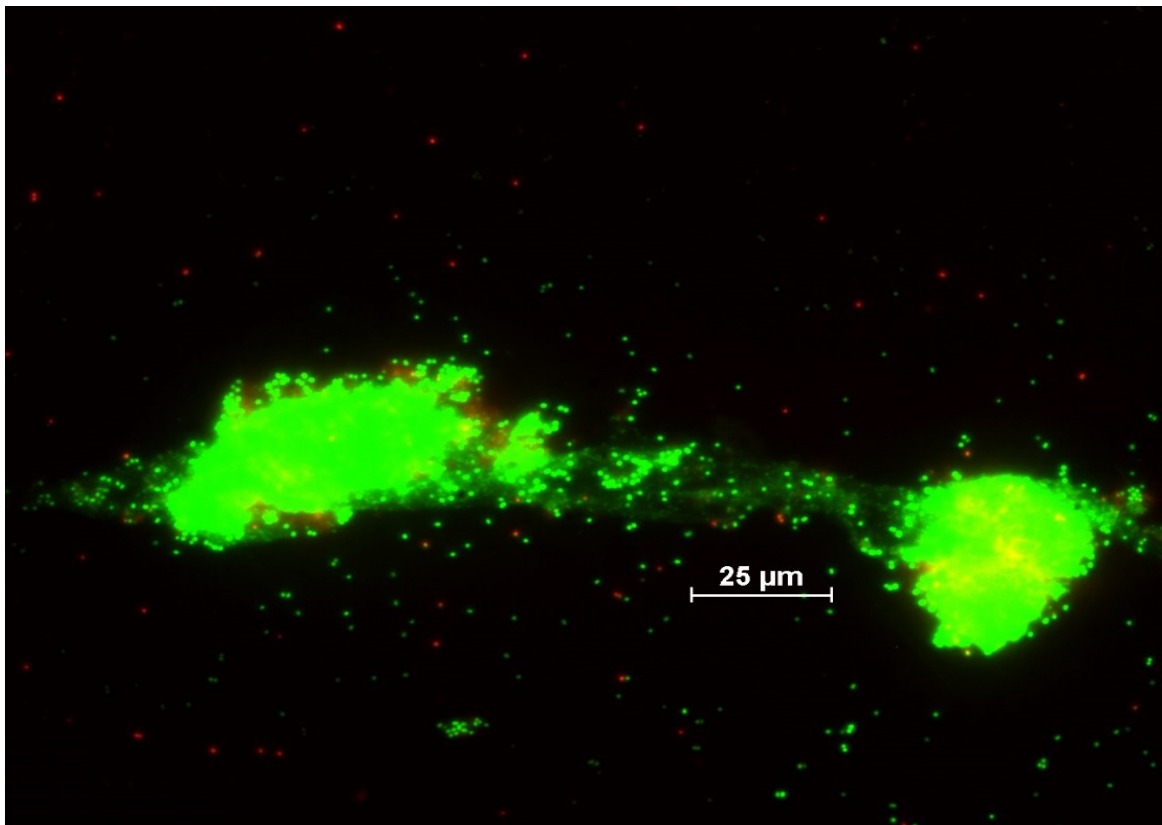
6.5.2.1.2. Barvení fluoroforem Syto 9

Fluorescenční barvivo Syto 9 pasivně difunduje skrz cytoplazmatickou membránu a váže se na DNA živých i neživých buněk. Jelikož jsou nukleové kyseliny přítomny také v mimobuněčné matrix, obarví barvivo opět celou biomasu biofilmu (Peeters *et al.*, 2008).

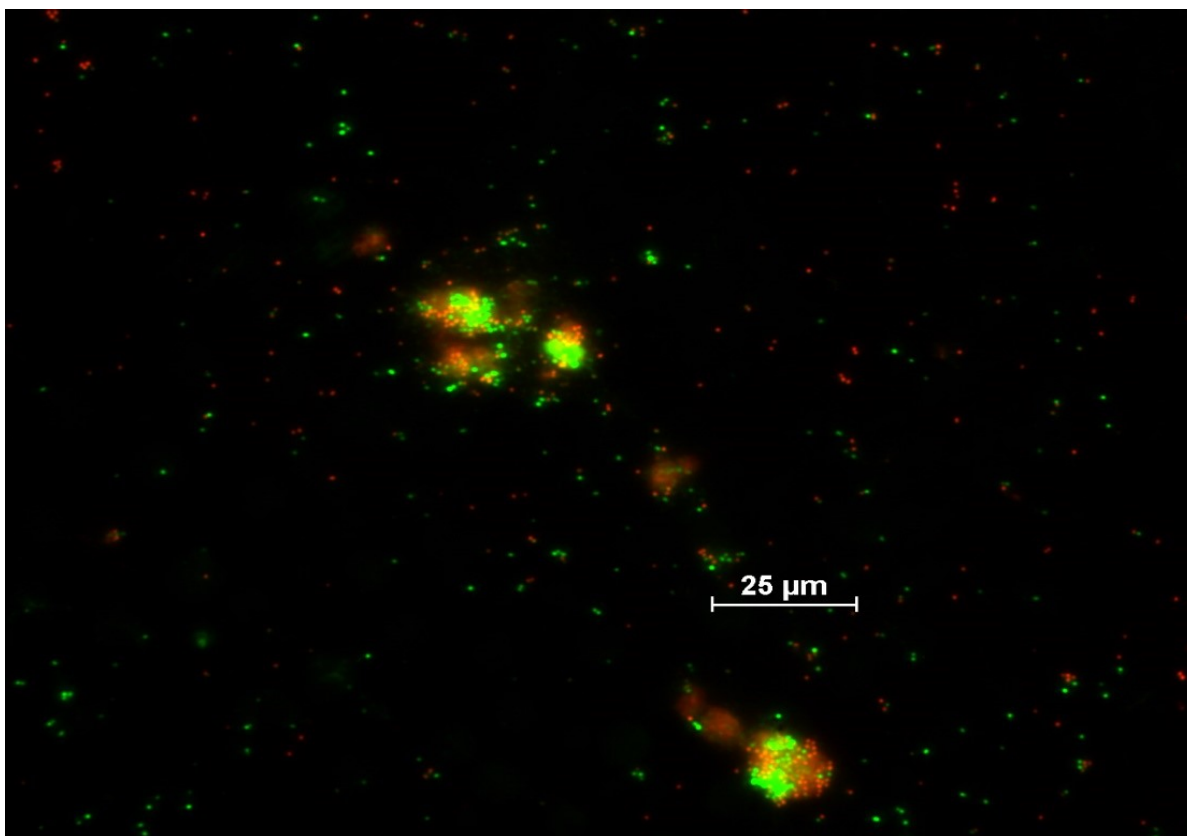
6.5.2.2. Kvantifikace živých buněk

6.5.2.2.1. LIVE/DEAD™ BacLight™

Kombinací výše zmíněného barviva Syto 9 s červeným barvivem propidium jodid (PI) lze dojít k rozlišení živých a mrtvých buněk či buněk s kompromitovanou membránou. Zatímco Syto 9 proniká do všech buněk přítomných v biofilmu, PI difunduje pouze do buněk s poškozenou cytoplazmatickou membránou. Fotografie stafylokokového biofilmu s buňkami barvenými metodou LIVE/DEAD níže (Obrázek 16 a 17).



Obrázek 14: Snímek z epifluorescenční mikroskopie. LIVE/DEAD™ barvení. Živé buňky bakterie *Staphylococcus epidermidis* a extracelulární nukleové kyseliny jsou obarveny do zelena (Syto 9). Mrtvé buňky, buňky s poškozenou membránou, jsou barveny do červena (propidium jodid). Poskytnuto RNDr. Klárou Konečnou, Ph.D., 2018



Obrázek 15: Snímek z epifluorescenční mikroskopie. LIVE/DEAD™ barvení. Živé buňky bakterie *Staphylococcus epidermidis* a extracelulární nukleové kyseliny jsou obarveny do zelena (Syto 9). Mrtvé buňky, buňky s poškozenou membránou, jsou barveny do červena (propidium jodid). Poskytnuto RNDr. Klárou Konečnou, Ph.D., 2018

6.5.2.2.2. XTT esej

Viabilitu buněk určitého kmene lze určit také na základě jejich metabolické aktivity. Jednou z metod založených na tomto principu je například hojně využívaná XTT esej. Metoda spočívá v redukci XTT barviva (tetrazoliová sůl, 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid) na ve vodě rozpustný fialový formazan činností metabolicky aktivních buněk. Následně je měřena absorbance supernatantu, která je přímo úměrná počtu metabolicky aktivních buněk (Peeters *et al.*, 2008; Riss *et al.*, 2013).

Metabolickou aktivitu buněk sledují i další metody. Princip resaruzinové eseje spočívá v redukci modrého resazurinu metabolicky aktivními buňkami na růžový fluorescenční resofurin. Viabilní buňky jsou rovněž schopné přeměnit nebarevný fluorescein diacitát (FDA) na žlutý fluorescein nespecifickými esterázami (Peeters *et al.*, 2008).

6.5.2.3. Kvantifikace matrix biofilmu

Kvantifikace matrice, zejména biofilmu stafylokoků, se provádí pomocí barviva 1,9-dimethyl methylenová modř (DMMB). DMMB tvoří nerozpustitelné produkty se sulfátovými skupinami polysacharidů matrix. Pro zjištění množství barviva se přidává ekvivalentní objem dekomplexačního činidla (Peeters *et al.*, 2008).

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1. EXPERIMENT 1

7.1.1. Hypotéza

Studium vlivu média (Soyabean média, Soyabean suplementovaného fetálním bovinním sérem (FBS) a Soyabean suplementovaného prasečí plazmou (PP)), způsobu inkubace (s mícháním a bez míchání) a vlivu velikosti počáteční optické hustoty (OD, Mc Farland) bakteriální suspenze (OD = 0,1; 0,5 a 1 s ředěním dle doporučení vzorové metodiky) na formování biofilmu u dvou vybraných kmenů bakterie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 29213, SA) a *methicilin-rezistentní Staphylococcus aureus* (ATCC 43300, MRSA) a jednoho kmene bakterie rodu *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35983, SE). Sledované podmínky jsou pro přehlednost shrnuty níže v Schématu 2. V dostupných publikacích je uváděno, že použité kmeny SA a MRSA jsou biofilm formující kmeny. Práce však jednotně nevysvětlují, jaký fenotyp kmeny vykazují, tedy zda jsou tzv. silnými, středně silnými či slabými producenty biofilmu. Použitý kmen SE má fenotyp deklarovaný – jedná se o silného producenta biofilmu a pro náš experiment tedy slouží jako kmen referenční.

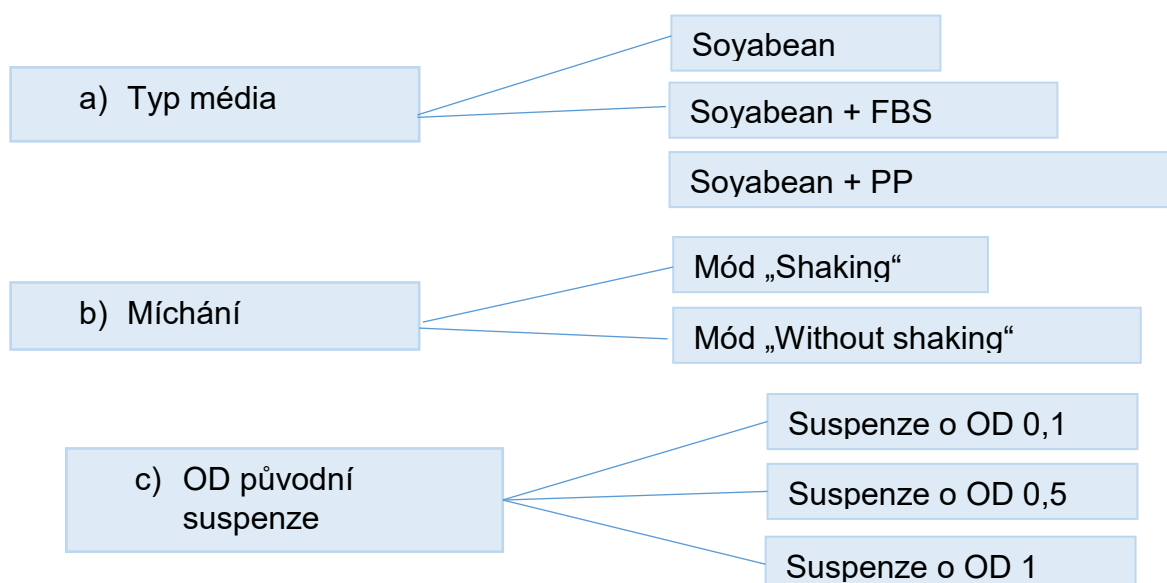


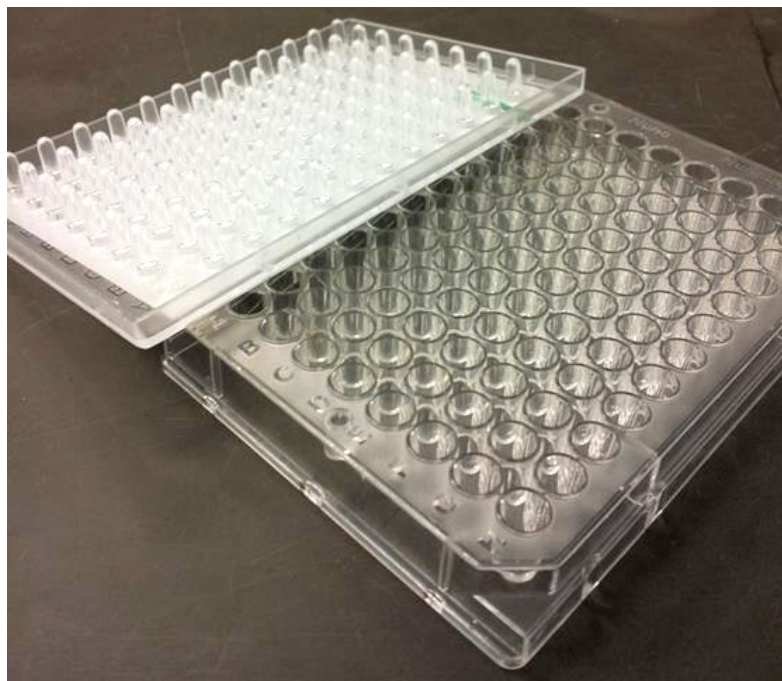
Schéma 2: Sledované podmínky Experimentu 1

K práci bude využito metodiky analogické TCBD (kapitola 6.4.1.3.). Cílem je navrhnout postupy, které povedou k formaci maximálně objemného bakteriálního biofilmu. Tyto *in vitro* formované robustní biofilmy budou následně využity pro navazující testování kandidátních antimikrobních látek, jejich anti-biofilmové aktivity (tento krok není náplní této práce).

Pomůcky a materiál

a) Pomůcky

- jednorázové očkovací kličky (Gamedium, Česká republika)
- sterilní OD zkumavky (Gamedium, Česká republika)
- stojany na zkumavky (Gamedium, Česká republika)
- sterilní mikrotitrační destičky bez víček (96 jamek, Gamedium, Česká republika) – Obrázek 18
- víčko s polypropylenovými kolíčky (Hard-Shell*PCR plates, 96 – Well Low-Profile, Semi-Skirted, Bio-Rad Laboratories, INC., USA)
- mikropipety (Fisher Scientific s.r.o., Česká republika)



Obrázek 16: Mikrotitrační TCBD destička s 96 jamkami a víčko s kolíčky. V rámci našeho testování využít podobný, finančně dostupnější systém. Převzato z: Mason et al., 2015

b) Přístroje a programy

- laminární box Esco Class II type A2 (Dynex laboratories s.r.o, Česká republika)
- vortex M52 Minishaker IKA (P-LAB, Česká republika)
- denzitometr DEN-18 McFarland Densitometer Biosan (P-LAB, Česká republika)
- kývačka MR-1 Mini Rocker-Shaker (Biosan, Litva)
- termostat Binder WTB (Fisher Scientific, Germany)
- třepací inkubátor Heidolph Inkubator 1000 (Heidolph, Germany)
- multidetekční reader Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate reader (Biotek Instruments, Inc, USA)
- software GraphPad Prism 7.0 (USA)

c) Materiál

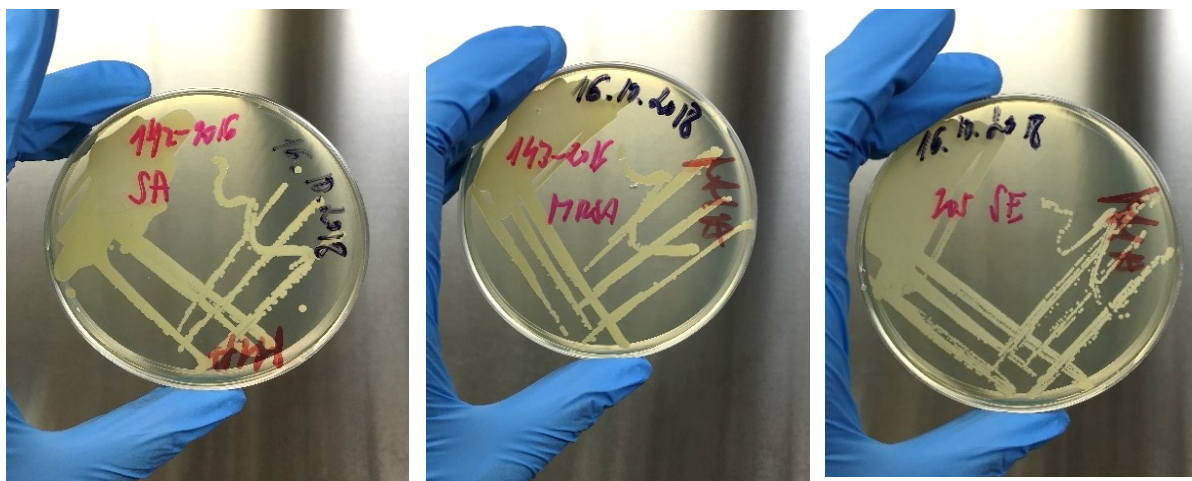
- plotny s Mueller-Hinton agarem (MHA, dodavatel: Čaderský – ENVITEK, s.r.o., Česká republika, Himedia, India)
- fetální hovězí sérum (FBS; Sigma, USA)
- inaktivovaná prasečí plazma (PP, Sigma, USA)
- soyabean médium – Soyabean Casein Digest Medium (Soyabean medium, dodavatel: Čaderský – ENVITEK, s.r.o., Česká republika; Himedia, India)
- sterilní fosfátový pufr (PBS, Sigma, USA)
- roztok krystalové violeti (P-LAB, Česká republika)
- extrakční činidlo (ethanol + aceton v poměru 80:20, Penta, Česká republika)

7.1.2. Použité bakteriální kmeny

Tabulka 1: Použité bakteriální kmeny

Označení	Bakterie	Identifikační kód
142-2016 (SA)	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213, CCM 4223
143-2016 (MRSA)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	ATCC 43300 CCM 4750
205-2018 (SE)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 35983 CCM 7844

Legenda: ATCC: Americká sbírka mikroorganismů, CCM: Česká sbírka mikroorganismů



Obrázek 17: Petriho misky na MHA s narostlými koloniemi bakterií *Staphylococcus aureus*, methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis* (A. Diepoltová, 2018)

7.1.3. Příprava médií

7.1.3.1. Soyabean médium

Soyabean bujón je tmavě žluté tekuté kultivační médium s vysokým obsahem aminokyselin. Jejich zdrojem je papaický digest sójových bobů a hydrolyzát kaseinu. Hydrogenfosforečnan draselný a glukóza působí jako pufr a zároveň zdroj uhlíku (HiMedia, 2018).

Příprava Soyabean média spočívá v rozpuštění 30 g komerčně dostupného prášku v 1 l destilované vody. V Erlenmayerově baňce je bujón sterilizován v autoklávu při teplotě 120 °C 15 minut.

7.1.3.2. Suplementace kultivačních médií

Obohacením kultivačního média o organickou složku předpokládáme výraznější růst v něm kultivovaných bakterií, a to díky vyššímu obsahu růstových faktorů, aminokyselin, cukrů a vitamínů. Pro tento experiment byly zvoleny dvě různé suplementační složky – FBS a prasečí plazma (PP).

FBS je tekutá frakce srážlivé krve získávané z plodu telete. Tekutina je zbavená buněk, fibrinu a srážlivých faktorů. Fetální sérum je oproti séru odebranému narozeným nebo dospělým jedincům pro suplementaci média výhodnější, jelikož obsahuje výraznější množství nutrientů, růstových faktorů a dalších makromolekulárních látek nezbytných pro buněčný růst. Další nespornou kultivační výhodou fetálního séra je nižší obsah proteinů komplementu. Tyto, v médiu nežádoucí, proteiny jsou schopny buňky lyzovat či interferovat při vyhodnocování experimentu. Velkou částí FBS je fetální albumin. Dalšími složkami jsou aminokyseliny, cukry, tuky a hormony (Johnson, 2012).

Druhou suplementační složkou byla, jako složením nejbližší lidské plazmě, zvolena plazma prasečí. Jedná se o nesrážlivou složku prasečí krve centrifugací oproštěnou od buněk. Kromě živin pro rostoucí buňky obsahuje albumin, prealbumin, glykoproteiny, transferrin, lipoproteiny, bílkoviny koagulační kaskády, ale také proteiny komplementu (Sigma-Aldrich s.r.o.).

Komplement musí být pro užití v mikrobiologických metodách inaktivován, aby nedocházelo k lýze kultivujících se bakterií. Inaktivace teplem probíhá ve vodní lázni při 56 °C po dobu 15-60 minut v závislosti na druhu plazmy (Montefiori Laboratory Duke University, 2018).

Pro přípravu suplementovaného média bylo ze 4 ml sójového bujonu odpipetováno 400 µl a nahrazeno 400 µl FBS, respektive prasečí plasmy (10% suplementace).

7.1.4. Pracovní postup

Den 0

- Naočkovat použité kmeny SA (142-2016), MRSA (143-2016) a SE (205-2018) na MHA.
- Inkubovat po dobu 16–20 hodin při 37 °C v termostatu.
- Sterilizovat víčka destiček peroctovou kyselinou přes noc.

Den 1

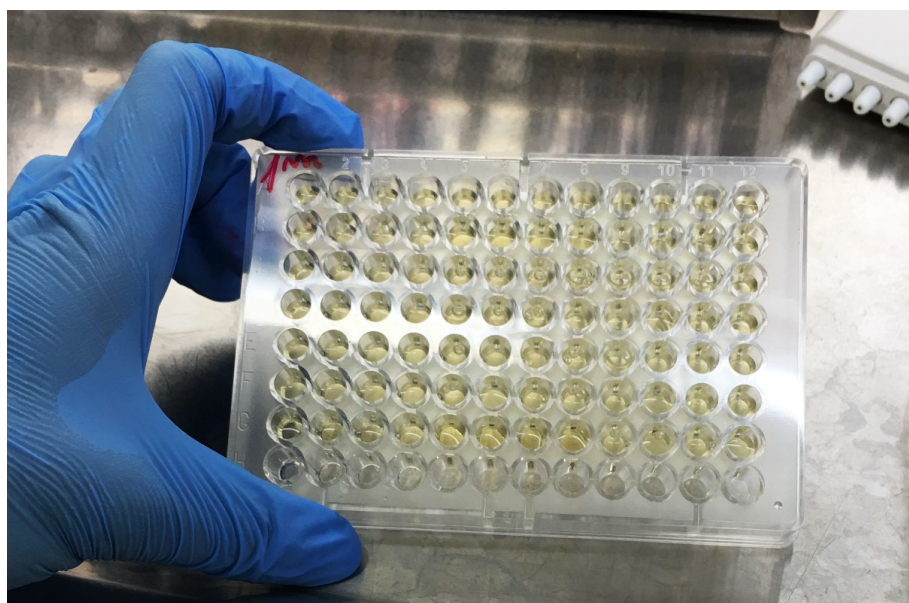
- Připravit 9 OD zkumavek s celkovým objemem kultivačního Soyabean média 4 ml.
- Připravit 9 OD zkumavek s celkovým objemem kultivačního Soyabean média 4 ml, suplementace 10% FBS.
- Připravit 9 OD zkumavek s celkovým objemem kultivačního Soyabean média 4 ml, suplementace 10% PP.
- Připravit bakteriální suspenze všech tří kmenů o optických denzitách (OD) OD = 0,1; OD = 0,5 a OD = 1.
 - Každý kmen zaočkovat do třech různých médií o třech různých optických denzitách.
- Naředit bakteriální suspenze o OD = 1 dle instrukcí výrobce MBEC eseje.
 - 100 µl suspenze přidat k 2,9 ml Soyabean média.
- Příprava mikrotitračních destiček (6 kusů) dle Schématu 3:
 - Do dvou destiček pipetovat po 150 µl bakteriální suspenze 3 testovacích kmenů o OD=0,1 (jedna pro studium vlivu kultivace bez míchání, druhá pro studium vlivu míchání).
 - Do dvou dalších destiček pipetovat po 150 µl suspenze o OD=0,5.
 - Do zbylých dvou destiček pipetovat po 150 µl suspenze o OD=1 s ředěním dle metodiky MBEC (dále jen OD = 1).



Schéma 3: Schéma zaočkování mikrotitračních destiček

Legenda: SA – kmen 142-2016 *S. aureus*; MRSA – kmen 143-2016 methicilin -rezistentní *S. aureus*; SE – kmen 205-2018 *S. epidermidis*; CS – negativní kontrola Soyabean média; CF – negativní kontrola Soyabean + FBS média; CP – kontrola Soyabean + PP média

- Proměřit OD při vlnové délce $\lambda = 580 \text{ nm}$ a $\lambda = 600 \text{ nm}$ pomocí multidetekčního readeru.
- Přiložit víčka a zavřené destičky oblepit parafilmem.
- Vložit do termostatu a inkubovat při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 24 hod.
 - Jednu destičku se všemi variantami OD inkubovat na kývačce.



Obrázek 18: Mikrotitrační destička s napipetovanými bakteriálními suspenzemi před inkubací (A. Diepoltová, 2018)

Den 2

- 2x promýt destičku sterilním PBS.
 - odpipetovat obsah jamek
 - do každé jamky napipetovat 200 μ l sterilního PBS
 - krátce míchat
 - odpipetovat obsah
 - opakovat postup
 - řádně odpipetovat promývací roztok
- 2x promýt kolíčky na víčku sterilním PBS.
 - použít čistou mikrotitrační destičku s napipetovanými 200 μ l sterilního PBS v každé jamce
 - víčko nasadit na čistou destičku
 - krátce míchat
 - odpipetovat obsah
 - opakovat postup
 - řádně odpipetovat promývací roztok
- Fixovat vytvořený biofilm teplem při 65 °C po dobu 10 minut.
- Fixovat vytvořený biofilm methanolem v lednici po dobu 15 minut.
 - po fixaci methanol odpipetovat a destičku vysušit na vzduchu
- Přidat 1% roztok čerstvě filtrované krystalové violeti.
 - nechat barvivo navazovat po dobu 10 minut
 - poté barvivo odpipetovat
 - promýt destičky pod velmi lehkým proudem kohoutkové vody
- Provést extrakci barviva.
 - do každé jamky mikrotitrační destičky napipetovat 160 μ l extrakčního činidla (ethanol + aceton v poměru 80:20)
 - kolíčky se ponoří do čisté mikrotitrační destičky s napipetovanými 160 μ l extrakčního činidla v každé jamce
 - nechat barvivo eluovat při míchání po dobu 15 minut
- Měřit OD destičky s eluovaným barvivem při vlnové délce 570 nm, 590 nm a 630 nm.

7.1.5. Hodnocení a výsledky

V Experimentu 1 byla provedena kvantifikace celkové biofilmové biomasy na základě měření absorbance navázané a následně extrahované barvičky, krystalové violeti. Nezávisle na sobě byly porovnávány výsledky nárůstu biofilmu na kolíčcích víčka mikrotitrační destičky a v samotných jamičkách destičky. Kultivace probíhala ve dvou módech - „Shaking“, ve kterém se destičky s víčky inkubovaly v termostatu na kývačce a „Without shaking“- kultivace destiček probíhala bez míchání. Pro lepší přehlednost je níže doplněno Schéma 4 znázorňující členění experimentu vždy pro jeden testovací kmen.

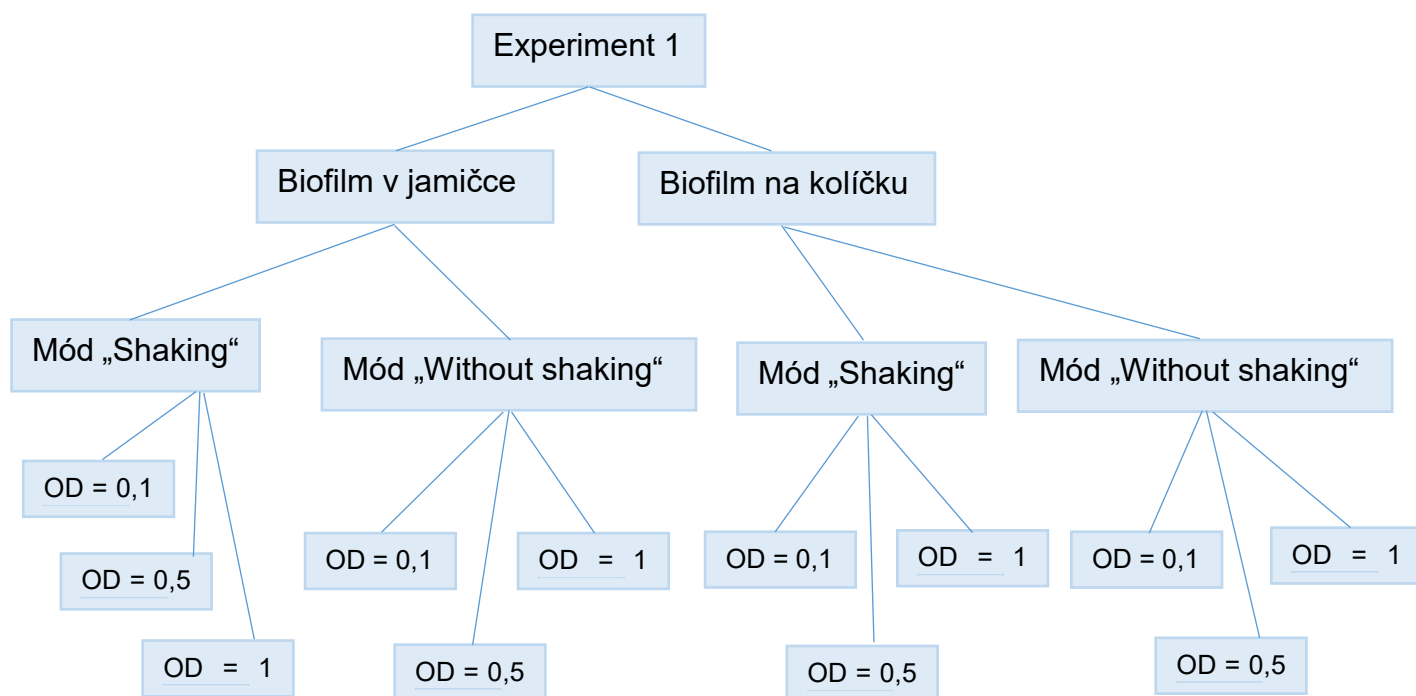


Schéma 4: Členění práce na Experimentu 1

7.1.5.1. Kvantifikace celkové biofilmové biomasy pomocí krystalové violeti

Všechny destičky s extrahovanou krystalovou violetí byly proměřeny pomocí multidetekčního readeru při vln délkách 570 nm, 590 nm a 630 nm. Pro ilustraci jsou v rámci Tabulky 2 uvedeny nezpracované výsledky získané v rámci

měření pro destičku kultivovanou v módu „Shaking“, počáteční optická denzita kmenů, OD=0,1.

Tabulka 2: Naměřené hodnoty absorbance extrahované krystalové violeti při třech volených vlnových délkách

	Staphylococcus aureus				MRSA				Staphylococcus epidermidis				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Soyabean	0,079	0,136	0,097	0,097	0,076	0,085	0,101	0,114	0,416	0,377	0,414	0,337	570
	0,078	0,134	0,111	0,088	0,111	0,105	0,111	0,108	0,362	0,281	0,341	0,389	590
	0,075	0,155	0,103	0,098	0,05	0,046	0,065	0,046	0,059	0,066	0,061	0,069	630
	0,091	0,132	0,076	0,085	0,048	0,049	0,082	0,049	0,077	0,184	0,061	0,103	570
Soyabean + FBS	0,294	0,411	0,178	0,264	0,326	0,235	0,349	0,196	1,45	0,599	1,177	1,357	570
	0,306	0,221	0,19	0,189	0,224	0,241	0,316	0,233	1,019	0,938	1,535	1,112	590
	0,294	0,411	0,178	0,264	0,326	0,235	0,349	0,196	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW	630
	0,294	0,411	0,178	0,264	0,326	0,235	0,349	0,196	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW	570
Soyabean + PP	0,059	0,168	0,051	0,072	0,066	0,046	0,046	0,045	0,069	0,079	0,113	0,068	570
	0,069	0,058	0,06	0,055	0,052	0,067	0,056	0,052	0,062	0,064	0,059	0,076	590
	0,063	0,052	0,057	0,051	0,048	0,062	0,052	0,049	0,058	0,06	0,055	0,072	630
	0,07	0,059	0,061	0,056	0,052	0,068	0,057	0,053	0,063	0,066	0,059	0,076	570
Kontrola	0,143	0,315	0,132	0,27	0,353	0,097	0,088	0,091	0,243	0,255	0,584	0,264	570
	0,153	0,337	0,153	0,31	0,146	0,103	0,096	0,101	0,283	0,291	0,692	0,313	590
	0,059	0,168	0,051	0,072	0,066	0,046	0,046	0,045	0,069	0,079	0,113	0,068	630
	0,07	0,059	0,061	0,056	0,052	0,068	0,057	0,053	0,063	0,066	0,059	0,076	570
Kontrola	0,069	0,058	0,06	0,055	0,052	0,067	0,056	0,052	0,062	0,064	0,059	0,076	590
	0,063	0,052	0,057	0,051	0,048	0,062	0,052	0,049	0,058	0,06	0,055	0,072	630
	0,07	0,059	0,061	0,056	0,052	0,068	0,057	0,053	0,063	0,066	0,059	0,076	570
	0,069	0,058	0,06	0,055	0,052	0,067	0,056	0,052	0,062	0,064	0,059	0,076	590
Kontrola	0,063	0,052	0,057	0,051	0,048	0,062	0,052	0,049	0,058	0,06	0,055	0,072	630
	0,063	0,052	0,057	0,051	0,048	0,062	0,052	0,049	0,058	0,06	0,055	0,072	570
	0,063	0,052	0,057	0,051	0,048	0,062	0,052	0,049	0,058	0,06	0,055	0,072	590
	0,063	0,052	0,057	0,051	0,048	0,062	0,052	0,049	0,058	0,06	0,055	0,072	630

Podmínky: Měření v jamičkách mikrotitrační destičky; původní denzita: OD=0,1; inkubace probíhala v módu „Shaking“ FBS – Fetální bovinní sérum, PP – prasečí plazma, OVRFLW – naměřený signál se nenachází v mezích detekovatelnosti přístroje

Na základě odborných publikací (Chen *et al.*, 2012; Barakat *et al.*, 2014; Souza, 2016), kde bylo využito stejného metodického přístupu pro kvantifikaci formovaných biofilmů a na základě získaných dat bylo rozhodnuto, že budou dále hodnoceny pouze výsledky měření absorbance při vlnové délce 630 nm – dále jako OD₍₆₃₀₎.

Níže v této práci jsou uváděny tabulky s vyhodnocenými daty dle postupu zmíněného v Tabulce 2. V rámci jedné destičky jsou vždy jednotlivé kmeny v jednotlivých médiích pipetovány v oktaplikátu. Stejně tak jsou vždy po osmi jamkách pipetovány i negativní kontroly, tedy čistá kultivační média. Hodnoty získané v rámci oktaplikátů (včetně negativních kontrol) jsou zprůměrovány a je proveden odečet „nespecifického příspěvku“ k celkové hodnotě absorbance,

podmíněný nespecifickou vazbou krystalové violeti k plastu, ze kterých jsou destičky či kolíčky ve víčku tvořeny.

Dalším krokem vyhodnocování Experimentu 1 bylo rozdělení tří použitých kmenů do kategorií podle schopnosti tvořit biofilm. Kategorizace probíhala podle Tabulky 3 (Usman *et al.*, 2011).

Tabulka 3: Kategorizace kmenů bakterií dle schopnosti tvořit biofilmy

Optická denzita	Míra tvorby biofilmu
$OD \leq OD_c$	Netvoří biofilm
$OD_c < OD \leq 2OD_c$	Slabý producent biofilmu
$2OD_c < OD \leq 4OD_c$	Středně silný producent biofilmu
$4OD_c < OD$	Silný producent biofilmu

Legenda: OD – zjištěná optická denzita, OD_c – zjištěná optická denzita kontroly pro konkrétní médium

Podle výše zmíněného kritéria jsou použité bakteriální kmeny rozděleny v Tabulkách 4-15. Pracovní postup odpovídá Schématu č.1. Hodnoty absorbancí pro jednotlivé kmeny v daném médiu jsou zprůměrované.

a) Měření v jamičkách mikrotitrační destičky – mód „Shaking“

Tabulka 4: Měření v jamičkách; původní OD = 0,1; mód: „Shaking“; $\lambda = 630 \text{ nm}$

	Měření v jamičkách; původní OD = 0,1; mód „Shaking“											
	Staphylococcus aureus				MRSA				Staphylococcus epidermidis			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Soyabean	$OD_{(630)} = 0,1025$ $OD_{cs(630)} = 0,0875$ Slabý producent				$OD_{(630)} = 0,10138$ $OD_{cs(630)} = 0,0875$ Slabý producent				$OD_{(630)} = 0,36463$ $OD_{cs(630)} = 0,0875$ Silný producent			
Soyabean + FBS	$OD_{(630)} = 0,1019$ $OD_{cf(630)} = 0,05075$ Středně silný producent				$OD_{(630)} = 0,05438$ $OD_{cf(630)} = 0,05075$ Slabý producent				$OD_{(630)} = 0,085$ $OD_{cf(630)} = 0,05075$ Slabý producent			
Soyabean + PP	$OD_{(630)} = 0,2566$ $OD_{cp(630)} = 0,08225$ Středně silný producent				$OD_{(630)} = 0,265$ $OD_{cp(630)} = 0,08225$ Středně silný producent				$OD_{(630)} = 1,14838$ $OD_{cp(630)} = 0,08225$ Silný producent			

Legenda: Zařazení použitých bakteriálních kmenů do kategorií dle schopnosti formovat biofilm; $OD_{cs(630)}$ – optická denzita negativní kontroly média Soyabean, $OD_{cf(630)}$ – optická denzita negativní kontroly média Soyabean + fetální bovinní sérum (FBS), $OD_{cp(630)}$ – optická denzita kontroly média Soyabean + prasečí plazma (PP)

Tabulka 5: Měření v jamičkách; původní OD = 0,5; mód „Shaking“; $\lambda = 630 \text{ nm}$

Měření v jamičkách; původní OD = 0,5; mód „Shaking“												
	Staphylococcus aureus				MRSA				Staphylococcus epidermidis			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Soyabean	OD ₍₆₃₀₎ = 0,096375 OD _{cs(630)} = 0,13875 Netvoří biofilm				OD ₍₆₃₀₎ = 0,12338 OD _{cs(630)} = 0,13875 Netvoří biofilm				OD ₍₆₃₀₎ = 0,29325 OD _{cs(630)} = 0,13875 Středně silný producent			
Soyabean + FBS	OD ₍₆₃₀₎ = 0,093375 OD _{cf(630)} = 0,0855 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,08825 OD _{cf(630)} = 0,0855 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,07325 OD _{cf(630)} = 0,0855 Netvoří biofilm			
Soyabean +PP	OD ₍₆₃₀₎ = 0,234875 OD _{cp(630)} = 0,06375 Středně silný producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,28163 OD _{cp(630)} = 0,06375 Silný producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,41388 OD _{cp(630)} = 0,06375 Silný producent			

Legenda: Zařazení použitých bakteriálních kmenů do kategorií dle schopnosti formovat biofilm; OD_{cs(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean, OD_{cf(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean + fetální bovinní sérum (FBS), OD_{cp(630)} – optická denzita kontroly média Soyabean + prasečí plazma (PP)

Tabulka 6: Měření v jamičkách; původní OD = 1; mód „Shaking“; $\lambda = 630 \text{ nm}$

Měření v jamičkách; původní OD = 1; mód „Shaking“												
	Staphylococcus aureus				MRSA				Staphylococcus epidermidis			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Soyabean	OD ₍₆₃₀₎ = 0,146375 OD _{cs(630)} = 0,16475 Netvoří biofilm				OD ₍₆₃₀₎ = 0,122125 OD _{cs(630)} = 0,16475 Netvoří biofilm				OD ₍₆₃₀₎ = 0,17125 OD _{cs(630)} = 0,16475 Slabý producent			
Soyabean +FBS	OD ₍₆₃₀₎ = 0,137625 OD _{cf(630)} = 0,35475 Netvoří biofilm				OD ₍₆₃₀₎ = 108875 OD _{cf(630)} = 0,35475 Netvoří biofilm				OD ₍₆₃₀₎ = 0,074375 OD _{cf(630)} = 0,35475 Netvoří biofilm			
Soyabean +PP	OD ₍₆₃₀₎ = 0,39 OD _{cp(630)} = 0,11725 Středně silný producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,387625 OD _{cp(630)} = 0,11725 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,373125 OD _{cp(630)} = 0,11725 Středně silný producent			

Legenda: Zařazení použitých bakteriálních kmenů do kategorií dle schopnosti formovat biofilm; OD_{cs(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean, OD_{cf(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean + fetální bovinní sérum (FBS), OD_{cp(630)} – optická denzita kontroly média Soyabean + prasečí plazma (PP)

b) Měření v jamičkách mikrotitrační destičky – mód „Without shaking“

Tabulka 7: Měření v jamičkách; původní OD = 0,1; mód: „Without shaking“; $\lambda = 630 \text{ nm}$

	Měření v jamičkách; původní OD = 0,1; mód „Without shaking“											
	Staphylococcus aureus				MRSA				Staphylococcus epidermidis			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Soyabean	OD ₍₆₃₀₎ = 0,10025				OD ₍₆₃₀₎ = 0,098				OD ₍₆₃₀₎ = 0,31875			
	OD _{cs(630)} = 0,0645				OD _{cs(630)} = 0,0645				OD _{cs(630)} = 0,0645			
	Slabý producent				Slabý producent				Silný producent			
Soyabean +FBS	OD ₍₆₃₀₎ = 0,09513				OD ₍₆₃₀₎ = 0,06425				OD ₍₆₃₀₎ = 0,069			
	OD _{cf(630)} = 0,05475				OD _{cf(630)} = 0,05475				OD _{cf(630)} = 0,05475			
	Slabý producent				Slabý producent				Slabý producent			
Soyabean +PP	OD ₍₆₃₀₎ = 0,13075				OD ₍₆₃₀₎ = 0,206125				OD ₍₆₃₀₎ = 0,97225			
	OD _{cp(630)} = 0,0795				OD _{cp(630)} = 0,0795				OD _{cp(630)} = 0,0795			
	Slabý producent				Středně silný producent				Silný producent			

Legenda: Zařazení použitých bakteriálních kmenů do kategorií dle schopnosti formovat biofilm; OD_{cs(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean, OD_{cf(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean + fetální bovinní sérum (FBS), OD_{cp(630)} – optická denzita kontroly média Soyabean + prasečí plazma (PP)

Tabulka 8: Měření v jamičkách; původní OD = 0,5; mód: „Without shaking“; $\lambda = 630 \text{ nm}$

	Měření v jamičkách; původní OD = 0,5; mód „Without shaking“											
	Staphylococcus aureus				MRSA				Staphylococcus epidermidis			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Soyabean	OD ₍₆₃₀₎ = 0,10075				OD ₍₆₃₀₎ = 0,10875				OD ₍₆₃₀₎ = 0,41225			
	OD _{cs(630)} = 0,09775				OD _{cs(630)} = 0,9775				OD _{cs(630)} = 0,9775			
	Slabý producent				Slabý producent				Silný producent			
Soyabean +FBS	OD ₍₆₃₀₎ = 0,105				OD ₍₆₃₀₎ = 0,06525				OD ₍₆₃₀₎ = 0,07263			
	OD _{cf(630)} = 0,078				OD _{cf(630)} = 0,078				OD _{cf(630)} = 0,078			
	Slabý producent				Netvoří biofilm				Netvoří biofilm			
Soyabean +PP	OD ₍₆₃₀₎ = 0,37838				OD ₍₆₃₀₎ = 0,3195				OD ₍₆₃₀₎ = 0,075			
	OD _{cp(630)} = 0,10575				OD _{cp(630)} = 0,10575				OD _{cp(630)} = 0,10575			
	Středně silný producent				Střední silný producent				Netvoří biofilm			

Legenda: Zařazení použitých bakteriálních kmenů do kategorií dle schopnosti formovat biofilm; OD_{cs(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean, OD_{cf(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean + fetální bovinní sérum (FBS), OD_{cp(630)} – optická denzita kontroly média Soyabean + prasečí plazma (PP)

Tabulka 9: Měření v jamičkách; původní OD = 1; mód: „Without shaking“; $\lambda = 630 \text{ nm}$

Měření v jamičkách; původní OD = 1; mód „Without shaking“												
	Staphylococcus aureus				MRSA				Staphylococcus epidermidis			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Soyabean	OD ₍₆₃₀₎ = 0,122 OD _{Cs(630)} = 0,05625 Středně silný producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,10775 OD _{Cs(630)} = 0,05625 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,2675 OD _{Cs(630)} = 0,05625 Silný producent			
Soyabean +FBS	OD ₍₆₃₀₎ = 0,1265 OD _{Cf(630)} = 0,0855 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,08013 OD _{Cf(630)} = 0,0855 Netvoří biofilm				OD ₍₆₃₀₎ = 0,08263 OD _{Cf(630)} = 0,0855 Netvoří biofilm			
Soyabean +PP	OD ₍₆₃₀₎ = 0,33263 OD _{Cp(630)} = 0,07675 Silný producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,20625 OD _{Cp(630)} = 0,07675 Silný producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,86763 OD _{Cp(630)} = 0,07675 Silný producent			

Legenda: Zařazení použitých bakteriálních kmenů do kategorií dle schopnosti formovat biofilm; OD_{Cs(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean, OD_{Cf(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean + fetální bovinní sérum (FBS), OD_{Cp(630)} – optická denzita kontroly média Soyabean + prasečí plazma (PP)

c) Měření na kolíčcích víčka – mód „Shaking“

Tabulka 10: Měření na kolíčcích; původní OD = 0,1; mód: „Shaking“; $\lambda = 630 \text{ nm}$

Měření na kolíčcích; původní OD = 0,1; mód „Shaking“												
	Staphylococcus aureus				MRSA				Staphylococcus epidermidis			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Soyabean	OD ₍₆₃₀₎ = 0,103625 OD _{Cs(630)} = 0,0615 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,093 OD _{Cs(630)} = 0,0615 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,079 OD _{Cs(630)} = 0,0615 Slabý producent			
Soyabean +FBS	OD ₍₆₃₀₎ = 0,072 OD _{Cf(630)} = 0,05325 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,061875 OD _{Cf(630)} = 0,05325 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,0675 OD _{Cf(630)} = 0,05325 Slabý producent			
Soyabean +PP	OD ₍₆₃₀₎ = 1,554125 OD _{Cp(630)} = 0,19125 Silný producent				OD ₍₆₃₀₎ = 1,345 OD _{Cp(630)} = 0,19125 Silný producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,156125 OD _{Cp(630)} = 0,19125 Netvoří biofilm			

Legenda: Zařazení použitých bakteriálních kmenů do kategorií dle schopnosti formovat biofilm; OD_{Cs(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean, OD_{Cf(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean + fetální bovinní sérum (FBS), OD_{Cp(630)} – optická denzita kontroly média Soyabean + prasečí plazma (PP)

Tabulka 11: Měření na kolíčkách; původní OD = 0,5; mód: „Shaking“; $\lambda = 630 \text{ nm}$

	Měření na kolíčkách; původní OD = 0,5; mód „Shaking“											
	Staphylococcus aureus				MRSA				Staphylococcus epidermidis			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Soyabean	OD ₍₆₃₀₎ = 0,270125 OD _{cs(630)} = 0,0585 Silný producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,17375 OD _{cs(630)} = 0,0585 Středně silný producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,28925 OD _{cs(630)} = 0,0585 Silný producent			
Soyabean +FBS	OD ₍₆₃₀₎ = 0,0595 OD _{cf(630)} = 0,05775 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,048375 OD _{cf(630)} = 0,05775 Netvoří biofilm				OD ₍₆₃₀₎ = 0,054125 OD _{cf(630)} = 0,05775 Netvoří biofilm			
Soyabean +PP	OD ₍₆₃₀₎ = 0,289 OD _{cp(630)} = 0,07075 Silný producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,565375 OD _{cp(630)} = 0,07075 Silný producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,086 OD _{cp(630)} = 0,07075 Slabý producent			

Legenda: Zařazení použitých bakteriálních kmenů do kategorií dle schopnosti formovat biofilm; OD_{cs(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean, OD_{cf(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean + fetální bovinní sérum (FBS), OD_{cp(630)} – optická denzita kontroly média Soyabean + prasečí plazma (PP)

Tabulka 12: Měření na kolíčkách; původní OD = 1; mód: „Shaking“; $\lambda = 630 \text{ nm}$

	Měření na kolíčkách; původní OD = 1; mód „Shaking“											
	Staphylococcus aureus				MRSA				Staphylococcus epidermidis			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Soyabean	OD ₍₆₃₀₎ = 0,103625 OD _{cs(630)} = 0,0615 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,093 OD _{cs(630)} = 0,0615 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,079 OD _{cs(630)} = 0,0615 Slabý producent			
Soyabean +FBS	OD ₍₆₃₀₎ = 0,072 OD _{cf(630)} = 0,05325 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,061875 OD _{cf(630)} = 0,05325 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,0675 OD _{cf(630)} = 0,05325 Slabý producent			
Soyabean +PP	OD ₍₆₃₀₎ = 1,554125 OD _{cp(630)} = 0,19125 Silný producent				OD ₍₆₃₀₎ = 1,345 OD _{cp(630)} = 0,19125 Silný producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,156125 OD _{cp(630)} = 0,19125 Netvoří biofilm			

Legenda: Zařazení použitých bakteriálních kmenů do kategorií dle schopnosti formovat biofilm; OD_{cs(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean, OD_{cf(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean + fetální bovinní sérum (FBS), OD_{cp(630)} – optická denzita kontroly média Soyabean + prasečí plazma (PP)

d) Měření na kolíčkách – mód „Without shaking“

Tabulka 11: Měření na kolíčkách; původní OD = 0,1; mód: „Without shaking“; $\lambda = 630 \text{ nm}$

Měření na kolíčkách; původní OD = 0,1; mód „Without shaking“												
	Staphylococcus aureus				MRSA				Staphylococcus epidermidis			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Soyabean	OD ₍₆₃₀₎ = 0,041875 OD _{cs(630)} = 0,038 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,041875 OD _{cs(630)} = 0,038 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,043875 OD _{cs(630)} = 0,038 Slabý producent			
Soyabean +FBS	OD ₍₆₃₀₎ = 0,037625 OD _{cf(630)} = 0,0375 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,038625 OD _{cf(630)} = 0,0375 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,039 OD _{cf(630)} = 0,0375 Slabý producent			
Soyabean +PP	OD ₍₆₃₀₎ = 0,110375 OD _{cp(630)} = 0,04525 Středně silný producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,140625 OD _{cp(630)} = 0,04525 Středně silný producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,044 OD _{cp(630)} = 0,04525 Netvoří biofilm			

Legenda: Zařazení použitých bakteriálních kmenů do kategorií dle schopnosti formovat biofilm; OD_{cs(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean, OD_{cf(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean + fetální bovinní sérum (FBS), OD_{cp(630)} – optická denzita kontroly média Soyabean + prasečí plazma (PP)

Tabulka 12: Měření na kolíčkách; původní OD = 0,5; mód: „Without shaking“; $\lambda = 630 \text{ nm}$

Měření na kolíčkách; původní OD = 0,5; mód „Without shaking“												
	Staphylococcus aureus				MRSA				Staphylococcus epidermidis			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Soyabean	OD ₍₆₃₀₎ = 0,04425 OD _{cs(630)} = 0,037 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,04475 OD _{cs(630)} = 0,037 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,03963 OD _{cs(630)} = 0,037 Slabý producent			
Soyabean +FBS	OD ₍₆₃₀₎ = 0,038125 OD _{cf(630)} = 0,0375 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,037375 OD _{cf(630)} = 0,0375 Netvoří biofilm				OD ₍₆₃₀₎ = 0,03925 OD _{cf(630)} = 0,0375 Slabý producent			
Soyabean +PP	OD ₍₆₃₀₎ = 0,13125 OD _{cp(630)} = 0,0515 Středně silný producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,0555 OD _{cp(630)} = 0,0515 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,0415 OD _{cp(630)} = 0,0515 Netvoří biofilm			

Legenda: Zařazení použitých bakteriálních kmenů do kategorií dle schopnosti formovat biofilm; OD_{cs(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean, OD_{cf(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean + fetální bovinní sérum (FBS), OD_{cp(630)} – optická denzita kontroly média Soyabean + prasečí plazma (PP)

Tabulka 13: Měření na kolíčkách; původní OD = 1; mód: „Without shaking“; $\lambda = 630 \text{ nm}$

Měření na kolíčkách; původní OD = 1; mód „Without shaking“												
	Staphylococcus aureus				MRSA				Staphylococcus epidermidis			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Soyabean	OD ₍₆₃₀₎ = 0,056 OD _{cs(630)} = 0,038 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,0555 OD _{cs(630)} = 0,038 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,0455 OD _{cs(630)} = 0,038 Slabý producent			
Soyabean +FBS	OD ₍₆₃₀₎ = 0,03925 OD _{cf(630)} = 0,038 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,03925 OD _{cf(630)} = 0,038 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,03988 OD _{cf(630)} = 0,038 Slabý producent			
Soyabean +PP	OD ₍₆₃₀₎ = 0,09175 OD _{cf(630)} = 0,04075 Středně silný producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,06425 OD _{cf(630)} = 0,04075 Slabý producent				OD ₍₆₃₀₎ = 0,04263 OD _{cf(630)} = 0,04075 Slabý producent			

Legenda: Zařazení použitých bakteriálních kmenů do kategorií dle schopnosti formovat biofilm; OD_{cs(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean, OD_{cf(630)} – optická denzita negativní kontroly média Soyabean + fetální bovinní sérum (FBS), OD_{cp(630)} – optická denzita kontroly média Soyabean + prasečí plazma (PP)

Z výsledků zaznamenaných v Tabulkách 4-15 bylo třeba vybrat kombinaci podmínek vedoucích k maximální formaci biofilmu tří vybraných kmenů bakterie rodu *Staphylococcus*. Zájem se tedy přesunul pouze na podmínky inkubace, které vedly k tvorbě robustních biofilmů tvořených kmeny spadajícími do kategorií „Silný producent“, případně alespoň „Středně silný producent“.

Nejvhodnější podmínky budou dále použity v Experimentu 2 při inkubaci klinických izolátů.

7.1.5.2. Volba místa formace biofilmu

Dostatečně robustní biofilm se na kolíčkách víčka mikrotitrační destičky formoval zejména v médiu Soyabean + PP, a to pouze v módu „Shaking“. Vysvětlení se zdá být logické – mícháním okolního média se nepohyblivé stafylokoky na kolíček přesunou snadněji.

Výsledky na kolíčkách však nepůsobí konzistentním dojmem. Například z Tabulky 10 je zřejmé, že biofilm kmenů SA a MRSA v médiu Soyabean + PP vznikal na kolíčkách bez problémů. Naopak na kolíčku s kmenem SE, který se již v předchozích tabulkách projevil několikrát jako silný producent, se biofilm vůbec nezformoval. Hypotetickým vysvětlením by zde mohlo být, že dříve nápomocné míchání biofilm z povrchu kolíčku odtrhlo. Dalším problémem by mohlo tvořit nevhodné složení plastu víčka systému. V metodice TCBD se užívá kolíčků polystyrenových, zatímco v rámci našeho experimentu bylo k dispozici víčko polypropylenové. Jako možnost řešení se nabízí takzvaný *coating*, čili potažení kolíčků vrstvičkou materiálu, na který bakterie lépe adherují. Tímto materiálem je například hydroxyapatit, celulóza atd. (Innovatech, Inc., 2019). Práce s potaženými povrchy kolíčků je podnětem pro následující experimenty.

Jamíčky mikrotitrační destičky vykazovaly spolehlivější výsledky, proto bylo rozhodnuto, že v Experimentu 2 již bude pozornost soustředěna pouze na ně.

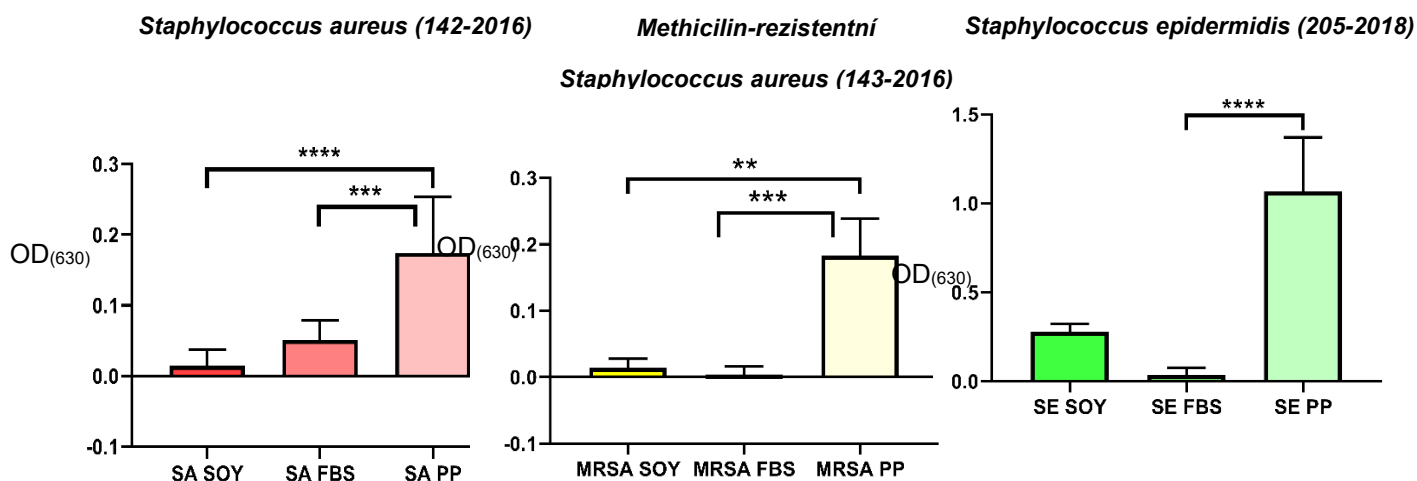
Výsledek: Vhodnějším místem systému pro formaci biofilmu bakteriálních kmenů 142-2016 (SA), 143-2016 (MRSA) a 205-2018 (SE) je jamička mikrotitrační destičky.

7.1.5.3. Volba inkubačního média

Kmeny SA a MRSA byly dle Tabulky 4 zařazeny mezi spíše průměrné producenty biofilmu. Kmen 205-2018 bakterie *Staphylococcus epidermidis*, jehož schopnost tvořit biofilm byla známá, se skutečně projevil jako silný biofilmový producent v médiích Soyabean a Soyabean+PP.

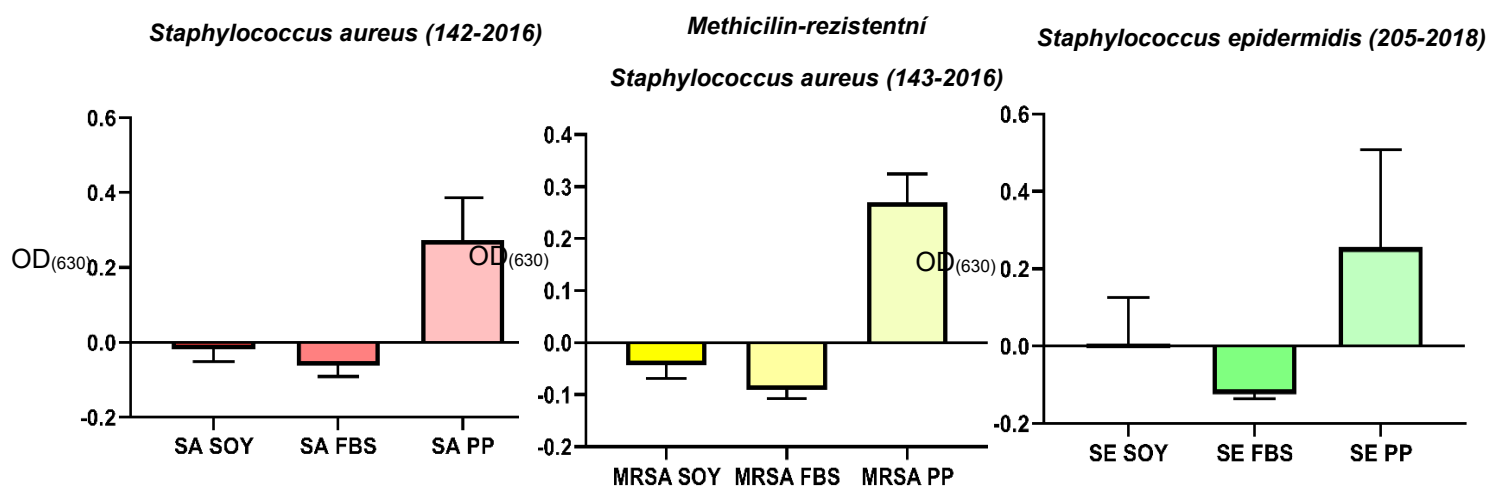
Médium Soyabean+FBS se ukázalo jako nepříliš vhodné pro formaci biofilmu u dvou kmenů 143-2016 (MRSA) a 205-2018 (SE) a ani u kmene 142-2016 (SA) nenabyl biofilm dostatečných rozměrů (Graf 2). Hypotetickým důvodem by mohlo být nevhodné proteinové složení fetálního bovinního séra nebo nedostatek proteinů, které by iniciovaly adhezi buněk.

Naopak jako nejvhodnější médium se jeví Soyabean+PP. Data byla hodnocena pomocí statistického programu GraphPad Prism 7.2 za pomoci jednosměrného ANOVA testu (míra statistické významnosti odpovídá počtu hvězdiček). Graf 2 jednoznačně demonstruje, že došlo ke statisticky významnější tvorbě biofilmu s využitím Soyabean+PP, a to u všech tří kmenů.



Graf 2: Porovnání nárůstu biofilmu kmene 142-2016 (SA) 143-2016 (MRSA) a 205-2018 (SE) v jamičkách, s optickou densitou původní suspenze = 0,1; mód inkubace „Shaking“ (Odpovídá Tabulce 4) SA SOY-*Staphylococcus aureus* inkubovaný v Soyabean médiu, SA FBS-*Staphylococcus aureus* inkubovaný v Soyabean médiu suplementovaném fetálním bovinním sérem, SA PP- *Staphylococcus aureus* inkubovaný v Soyabean médiu suplementovaném prasečí plazmou. MRSA SOY-Mehicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* inkubovaný v Soyabean médiu, MRSA FBS-Mehicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* inkubovaný v Soyabean médiu suplementovaném fetálním bovinním sérem, MRSA+PP -Mehicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* inkubovaný v Soyabean médiu suplementovaném prasečí plazmou, SE SOY-*Staphylococcus epidermidis* inkubovaný v Soyabean médiu, SE FBS-*Staphylococcus epidermidis* inkubovaný v Soyabean médiu suplementovaném fetálním bovinním sérem, SE PP-*Staphylococcus epidermidis* inkubovaný v Soyabean médiu suplementovaném prasečí plazmou

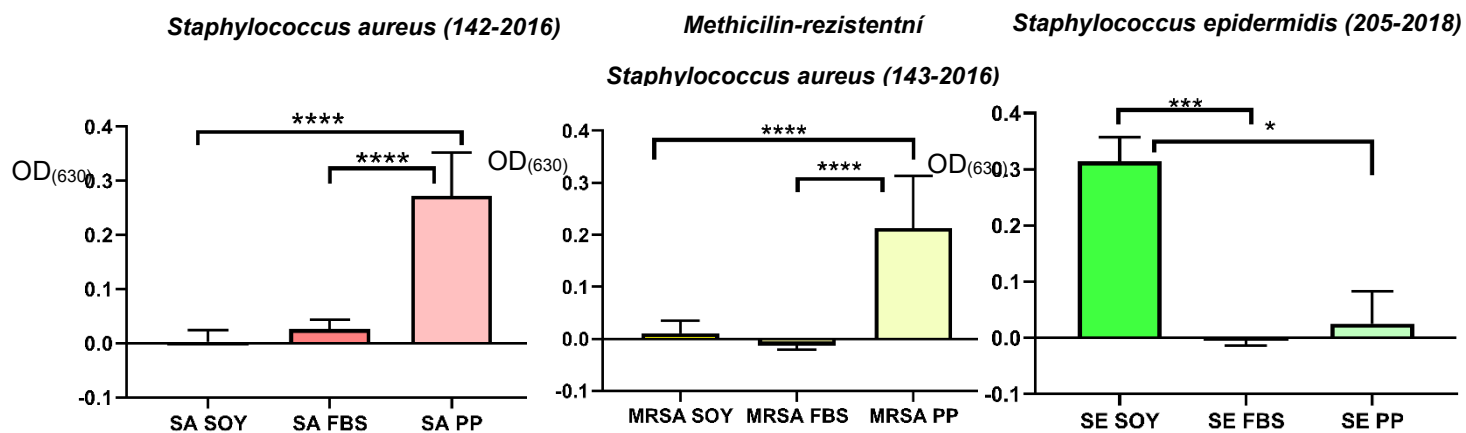
V tabulkách se stejnými podmínkami (vazba na jamičky, mód „Shaking“), ale s vyšší původní optickou denzitou – 0,5; 1 (Tabulka č. 5 a 6), nebyly výsledky příliš uspokojivé. Biofilmy všech tří kmenů se zde formovaly poměrně slabě. Jako nejlepší médium se opět ukázalo Soyabean+PP. Kmen MRSA a SE kultivovaný v plazmu suplementovaném médiu dosáhl úrovně „Silný producent“ v Tabulce 5 (původní OD = 0,5). Původní denzita OD = 1 se v módu „Shaking“ ukazuje jako nevhodná. Bakteriální biofilm v přijatelné míře se zformoval opět pouze v médiu Soyabean+PP (Graf 3). Výhodou plazmy, v porovnání se suplementací sérem, může být přítomnost srážecích faktorů a dalších proteinů, které by hypoteticky fungovaly jako výše zmíněný coating a iniciovaly tak adhezi bakteriálních buněk.



Graf 3: Porovnání vlivu média při formaci biofilmu kmene 142-2016 (SA), 143-2016 (MRSA) a 205-2018 (SE) v jamičkách s OD původní suspenze = 1; mód inkubace „Shaking“ (Odpovídá Tabulce 6) SA SOY – Staphylococcus aureus inkubovaný v Soyabean médiu, SA FBS–Staphylococcus aureus inkubovaný v Soyabean médiu suplementovaném fetálním bovinním sérem, SA PP – Staphylococcus aureus inkubovaný v Soyabean médiu suplementovaném prasečí plazmou. MRSA SOY–Mehicilin rezistentní Staphylococcus aureus inkubovaný v Soyabean médiu, MRSA FBS–Mehicilin rezistentní Staphylococcus aureus inkubovaný v Soyabean médiu suplementovaném fetálním bovinním sérem, MRSA+PP–Mehicilin rezistentní Staphylococcus aureus inkubovaný v Soyabean médiu suplementovaném prasečí plazmou, SE SOY–Staphylococcus epidermidis inkubovaný v Soyabean médiu, SE FBS–Staphylococcus epidermidis inkubovaný v Soyabean médiu suplementovaném fetálním bovinním sérem, SE PP–Staphylococcus epidermidis inkubovaný v Soyabean médiu suplementovaném prasečí plazmou

Zdá se, že inkubaci v médiu Soyabean+PP je velmi nápomocný mód s mícháním. Kmeny inkubované v Soyavean+PP módu „Shaking“ (Tabulky 4, 5, 6, 10, 11 a 12) častěji řadíme do skupiny „Silný producent“ než ty, jenž byly v tomto médiu inkubovány bez míchání (např. Tabulka č. 8 a Graf 4). Výjimkou je Tabulka 9, kde, ač inkubace probíhala bez míchání, nabyl biofilm velké hmoty. V ostatních tabulkách popisujících situaci bez míchání považujeme ojedinělý nárůst biofilmu (jako je tomu například v Grafu 4 – kmen SE v médiu Soyabean)

spíše za dílo kontaminace. Médium Soyabeen+PP se však i zde zdá být nejlepší volbou.

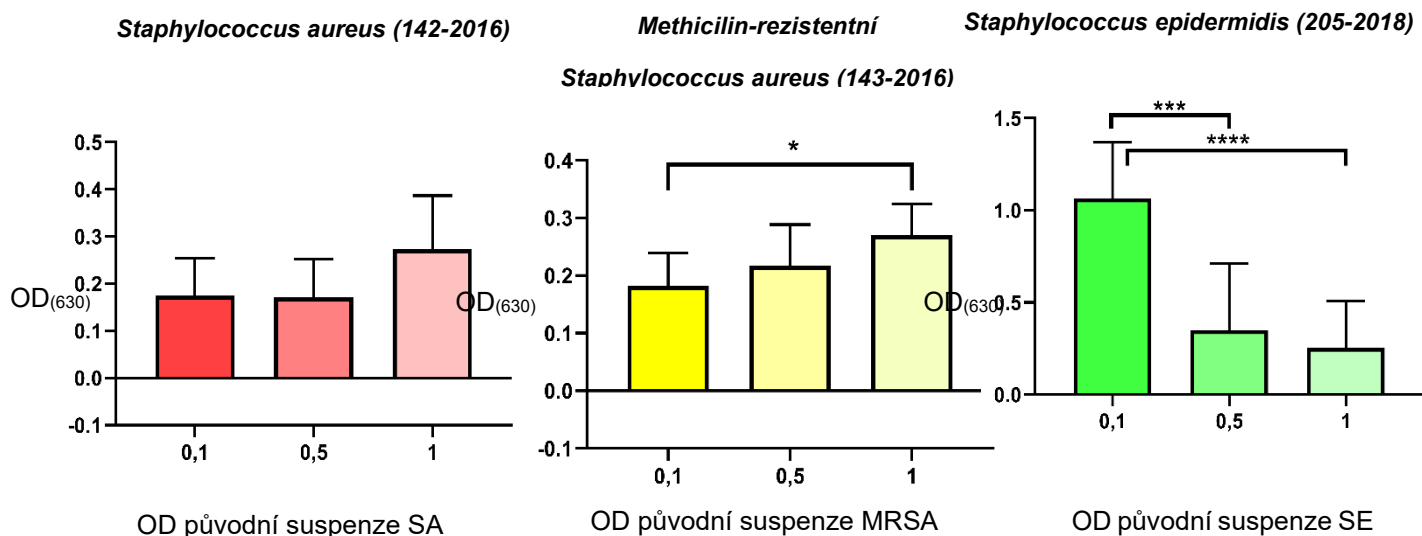


Graf 4: Porovnání vlivu média při formaci biofilmu kmene 142-2016 (SA), 143-2016 (MRSA) a 205-2018 (SE) v jamičkách s OD původní suspenze = 0,5; mód inkubace „Without shaking“ (Odpovídá Tabulce 7) SA SOY – *Staphylococcus aureus* inkubovaný v Soyabeen médiu, SA FBS–*Staphylococcus aureus* inkubovaný v Soyabeen médiu suplementovaném fetálním bovinním sérem, SA PP – *Staphylococcus aureus* inkubovaný v Soyabeen médiu suplementovaném prasečí plazmou. MRSA SOY–Mehicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* inkubovaný v Soyabeen médiu, MRSA FBS–Mehicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* inkubovaný v Soyabeen médiu suplementovaném fetálním bovinním sérem, MRSA+PP–Mehicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* inkubovaný v Soyabeen médiu suplementovaném prasečí plazmou, SE SOY–*Staphylococcus epidermidis* inkubovaný v Soyabeen médiu, SE FBS–*Staphylococcus epidermidis* inkubovaný v Soyabeen médiu suplementovaném fetálním bovinním sérem, SE PP–*Staphylococcus epidermidis* inkubovaný v Soyabeen médiu suplementovaném prasečí plazmou

Výsledek: Jako nejvhodnější médium k formaci biofilmu bakteriálních kmenů 142-2016 (SA), 143-2016 (MRSA) a 205-2018 (SE) bylo určeno Soyabeen médium suplementované prasečí plazmou.

7.1.5.4. Volba denzity původní suspenze

Na základě porovnání výsledků z Tabulek 4-15 byla jako nejvhodnější zvolena počáteční denzita 0,1. Graf 5 zobrazuje situaci s předchozími vybranými podmínkami, tedy v inkubačním módu „Shaking“, v médiu Soyabean suplementovaném prasečí plazmou a měření v rámci jamiček mikrotitrační destičky. Graf 5 - SA ukazuje, že biofilm narostlý z původní suspenze o optické denzitě 0,1 dosáhl mocnosti srovnatelné s biofilmem vzniklým ze suspenze o OD 0,5 a dokonce menší než biofilm ze suspenze s OD 1. MRSA biofilm ze suspenze o OD 0,1 byl dokonce nejmenší. Graf s SE ale dokazuje, že biofilm formovaný z počáteční suspenze 0,1 je statisticky významně větší oproti biofilmu vzniklému ze suspenze 0,5 i 1. Jelikož je použitý kmen SE ověřený silný producent biofilmu a pro náš experiment slouží jako kmen referenční, jsou pro nás jeho výsledky stěžejní.



Graf 5: Porovnání vlivu počáteční optické denzity při formaci biofilmu kmenů 142-2016 (SA), 143-2016 (MRSA) a 205-2018 (SE) v různých optických denzitách původních suspenzí, měření v Soyabean médiu suplementovaném prasečí plazmou, v jamičkách, mód inkubace „Shaking“. (Odpovídá Tabulkám 4, 5, 6). OD – optická denzita počáteční suspenze, SA – *Staphylococcus aureus*, MRSA – *Methicilin rezistentní Staphylococcus aureus*, SE – *Staphylococcus epidermidis*

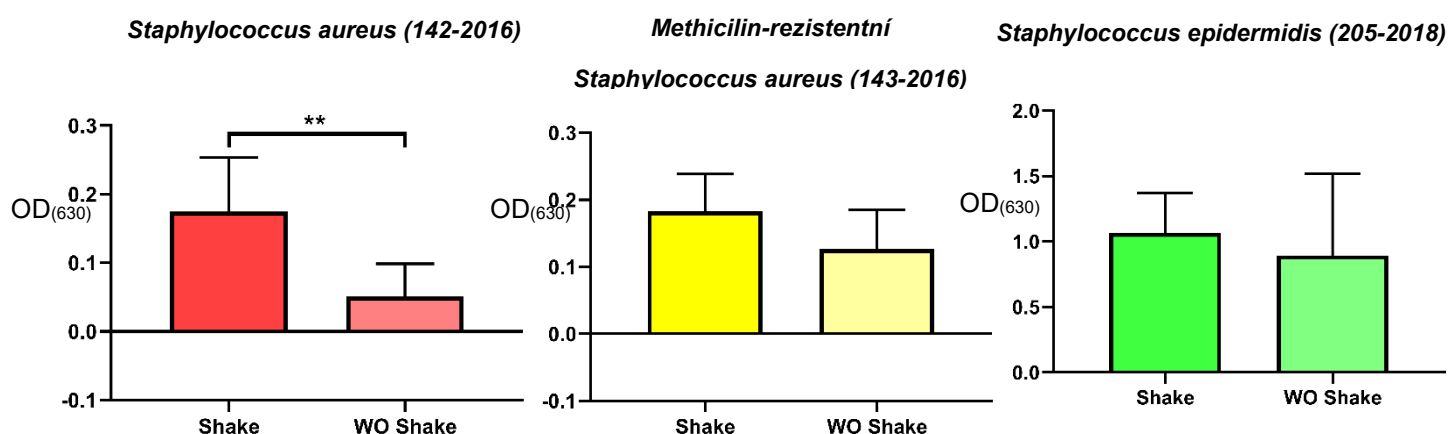
Výsledek: Jako nejvhodnější počáteční OD pro formaci biofilmu bakteriálních kmenů 142-2016 (SA), 143-2016 (MRSA) a 205-2018 (SE) byla vybrána optická denzita 0,1

7.1.5.5. Volba módu inkubace

Jak již bylo naznačeno výše, zdá se, že má shaking na inkubaci pozitivní efekt. Z Tabulky 4 vyplývá, že všechny použité kmeny, které byly do jamky mikrotitrační destičky pipetovány v původní suspenzi o $OD = 0,1$, dokázaly vytvořit biofilm za pomoci míchání při inkubaci, což byl pro nás povzbudivý výsledek. Bylo očekáváno, že nepohyblivým bakteriím, kterými stafylokokové jsou, pomůže pohyb okolního média adherovat na větší plochu jamky. Zároveň bylo snahou co nejlíže napodobit situaci *in vivo*. Biofilmy v organismu hostitele často vznikají na místech s proudící okolní tekutinou (žilní a močové katery, zubní sklovina, ...) nebo přímo v místě pohybu tkání (kloubní náhrady). Mód „Shaking“ tedy tuto situaci připomíná lépe.

I další tabulky, které shrnují nárusty biofilmu po inkubaci s pomocí míchání (Tabulky 5, 6, 10, 11 a 12) prokazují jeho výhodu. Zjednodušeně lze říct, že více silných producentů najdeme v tabulkách popisujících mód „Shaking“.

Výhodu míchání při inkubaci v médiu Soyabean+PP při formaci biofilmu z vybrané původní $OD = 0,1$ zobrazuje Graf 6.



Graf 6: Porovnání vlivu módu inkubace při formaci biofilmu kmenů 142-2016 (SA), 143-2016 (MRSA) a 205-2018 (SE) po inkubaci ve dvou různých módech „Shaking“ a „Without shaking“, měření v jamičkách, médium Soyabean + PP, původní optická denzita = 0,1 (Odpovídá Tabulkám 4 a 8). Shake – režim inkubace s mícháním, WO Shake – režim inkubace bez míchání

Výsledek: Jako nejvhodnější inkubační mód byl zvolen „Shaking“, tedy mód s mícháním při inkubaci.

7.2. EXPERIMENT 2

7.2.1. Hypotéza

Mapování biofilmového fenotypu sbírkových klinických izolátů rodu *Staphylococcus*. Ověření postupu Experimentu 1 vedoucího k formaci maximálně objemného bakteriálního biofilmu pro další navazující studie anti-biofilmové aktivity kandidátních antimikrobních látek.

7.2.2. Pomůcky a materiál

a) Pomůcky

- jednorázové očkovací kličky (Gamedium, Česká republika)
- sterilní OD zkumavky (Gamedium, Česká republika)
- stojany na zkumavky (Gamedium, Česká republika)
- sterilní mikrotitrační destičky bez víček (96 jamek, Gamedium, Česká republika)

b) Přístroje a programy

- laminární box Esco Class II type A2 (Dynex laboratories s.r.o, Česká republika)
- vortex M52 Minishaker IKA (P-LAB, Česká republika)
- denzitometr DEN-18 McFarland Densitometer Biosan (P-LAB, Česká republika)
- kývačka MR-1 Mini Rocker-Shaker (Biosan, Litva)
- termostat Binder WTB (Fisher Scientific, Germany)
- multidetekční reader Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate reader (Biotek Instruments, Inc. USA)
- třepací inkubátor Heidolph Inkubator 1000 (Heidolph, Germany)

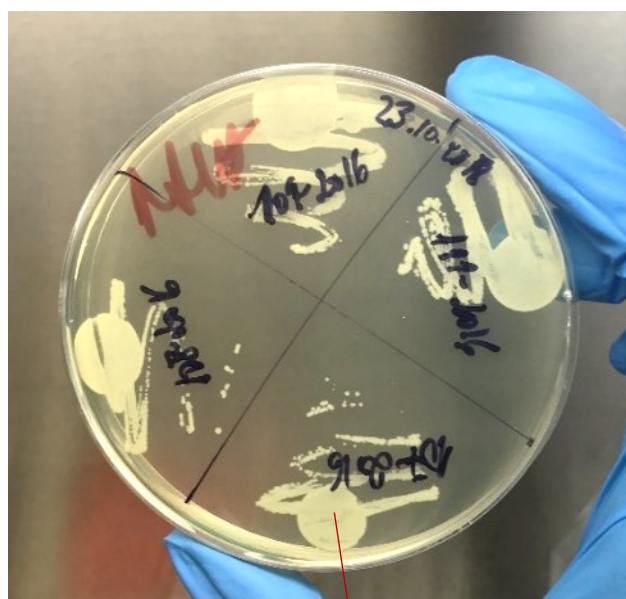
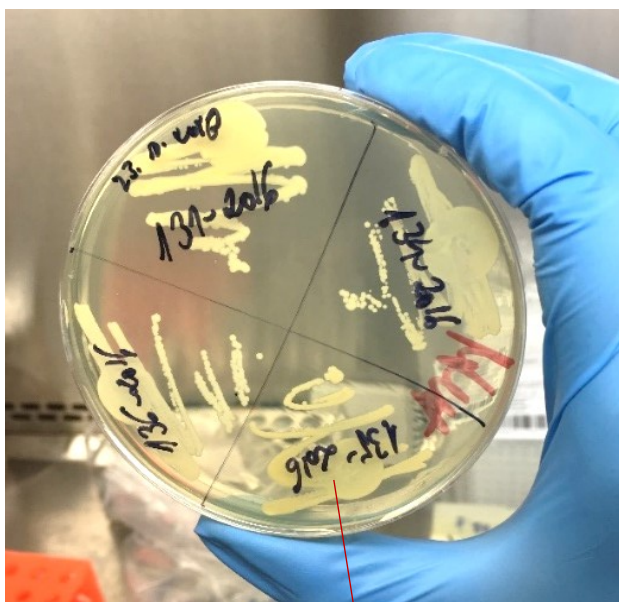
d) Materiál

- sterilní plotny s Mueller-Hinton agarem (MHA, dodavatel: Čaderský – ENVITEK, s.r.o., Česká republika, Himedia, India)
- inaktivovaná prasečí plazma (PP, Sigma, USA)
- soyabean Casein Digest Medium (Soyabean medium, dodavatel: Čaderský – ENVITEK, s.r.o., Česká republika; Himedia, India)
- sterilní fosfátový pufr (PBS, Sigma, USA)
- roztok krystalové violeti (P-LAB, Česká republika)
- extrakční činidlo (ethanol + aceton v poměru 80:20, Penta, Česká republika)

1.1.1. Použité klinické izoláty

Tabulka 14: Použité klinické izoláty s místem odběru (pokud bylo uvedeno)

Označení	Bakterie	Původ
70-2016	<i>Staphylococcus hominis</i>	Hrudní dren
73-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	Centrální žilní katetr
74-2016	<i>Staphylococcus capitis</i>	Periferní žilní katetr
106-2016	<i>Staphylococcus hominis</i>	Centrální žilní katetr
107-2016	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Centrální žilní katetr
108-2016	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Centrální žilní katetr
109-2018	<i>Staphylococcus hominis</i>	Centrální žilní katetr
111-2016	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Močový katetr
131-2016	<i>Staphylococcus aureus</i> – MRSA	Výtěr z krku
134-2016	<i>Staphylococcus aureus</i> – MRSA	Stěr dekubitu
135-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sputum CF
136-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	Larynx
137-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	Popálenina
138-2016	<i>Staphylococcus aureus</i> – MRSA	Sputum
139-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	Stěr z rány sternu
140-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	Stěr z rány sternu
141-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	Výtěr z oka
144-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bez bližší specifikace
148-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bronchoalveolární laváž
149-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	Stěr z rány hrudníku
150-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bez bližší specifikace
151-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	Výtěr z krku
152-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bronchoalveolární laváž
153-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	Laryng
154-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bronchoalveolární laváž



A) Nažloutlé kolonie *Staphylococcus aureus*

Bílé kolonie *Staphylococcus epidermidis*

Obrázek 19: Snímky bakteriálních kolonií narostlých na Mueller-Hinton agaru. Kmeny použité v Experimentu 2 A) *Staphylococcus aureus*, B) *Staphylococcus epidermidis* (A. Diepoltová, 2018)

1.1.2. Příprava média Soyabean + PP

Pro přípravu média Soyabean + PP bylo 10 % objemu zásobního Soyabean média suplementováno prasečí plazmou. Do OD zkumavky bylo napipetováno 2,5 ml Soyabean média a 250 μ l nahrazeno prasečí plazmou.

1.1.3. Pracovní postup

Den 0

- Naočkovat kmeny bakterie rodu *Staphylococcus* na MHA.
- Inkubovat v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 16-20 hodin.

Den 1

- Připravit bakteriální suspenze s OD = 0,1.
- Napipetovat 150 μ l suspenze do jamek mikrotitrační destičky dle Schématu 5 a 6.
- Proměřit OD při vlnové délce $\lambda = 580$ nm a $\lambda = 600$ nm.
- Přiložit víčko a oblépit parafilmem.
- Vložit do termostatu a inkubovat při 37 °C 48 hodin za mírného míchání.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	12										
B		70			73			74			106
C		107			108			109			111
D		143			131			134			135
E											
F		136			137			X			Kontrola a média

Schéma 5: Mikrotitrační destička 1 – Způsob zaočkování klinickými izoláty bakterie rodu *Staphylococcus*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	11	12								
B		138			139			140		141
C		144			148			149		150
D		151			152			153		154
E										
F		205			143			X		Kontrola média

Schéma 6: Mikrotitrační destička 2 – Způsob zaočkování klinickými izoláty bakterie rodu *Staphylococcus*

Den 3

- 2x promýt destičku sterilním PBS.
 - odpipetovat obsah jamek
 - do každé jamky napipetovat 200 μ l sterilního PBS
 - krátce míchat
 - odpipetovat obsah
 - opakovat postup
 - řádně odpipetovat promývací roztok
- Fixovat vytvořený biofilm teplem při 65 °C po dobu 10 minut.
- Fixovat vytvořený biofilm ledovým methanolem.
 - pipetovat 170 μ l do každé jamky
 - nechat fixovat v lednici po dobu 15 minut
 - po fixaci methanol odpipetovat a destičku vysušit
- Přidat 1% roztok čerstvě filtrované krystalové violeti.
 - napipetovat 170 μ l krystalové violeti do každé jamky
 - nechat navazovat po dobu 10 minut
 - poté barvivo odpipetovat
 - promýt destičky pod velmi lehkým proudem kohoutkové vody
- Provést extrakci barviva.
 - do každé jamky mikrotitrační destičky napipetovat 160 μ l extrakčního činidla (ethanol + aceton v poměru 80:20)
 - nechat barvivo eluovat při míchání po dobu 15 minut
- Měřit OD destičky s eluovanou barvivem při vlnové délce 630 nm, 570 nm, 560 nm a 590 nm.

1.1.4. Hodnocení a výsledky

Cílem Experimentu 2 bylo určit biofilmový fenotyp 25 klinických izolátů rodu *Staphylococcus*. Kmeny zařazené do kategorie „Středně silný producent“ a „Silný producent“ budou využity v rámci následných studií anti-biofilmové aktivity. K inkubaci bylo využito podmínek vyhodnocených v Experimentu 1 jako nejvhodnější pro maximální formaci biomasy biofilmu. Naměřené hodnoty

absorbance při vlnové délce 570 nm, 590 nm a 630 nm pro jednotlivé klinické izoláty inkubované při míchání z původní suspenze o OD = 0,1 v médiu Soyabean + PP jsou zahrnuty v Tabulkách 18 a 20. Pro hodnocení byla opět využita data z měření při vlnové délce 630 nm.

Izoláty jsou rozděleny do dvou tabulek podle mikrotitračních destiček, ve kterých byly inkubovány. Posledních 6 jamek obsahuje pouze médium, značí tedy kontrolu. Izoláty byly následně zařazeny do kategorií dle schopnosti formovat biofilm v Tabulkách 19 a 21 (podle kategorizace z Tabulky 17).

Tabulka 15: Kategorizace klinických izolátů bakterií dle schopnosti formovat biofilmy

Optická denzita OD ≤ OD _c	Míra tvorby biofilmu Netvoří biofilm
OD _c < OD ≤ 2OD _c	Slabý producent biofilmu
2OD _c < OD ≤ 4 OD _c	Středně silný producent biofilmu
4OD _c < OD	Silný producent biofilmu

Legenda: OD – zjištěná optická denzita, OD_c – zjištěná optická denzita kontroly

a) Mikrotitrační destička 1

Tabulka 16: Hodnocení schopnosti formace biofilmu klinických izolátů bakterie *Staphylococcus spp.*; naměřené hodnoty absorbance pro kmen s daným číselným označením

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	70			73			74			106			
A			0,102	0,079	0,08	0,141	1,335	OVRFLW	3,382	0,321		0,607	570
		0,6	0,113	0,086	0,087	0,124	1,618	OVRFLW	OVRFLW		0,605	0,716	590
	0,085	0,111	0,05	0,045	0,046	0,052	0,219	0,661	0,505	0,075	0,1	0,116	630
B	0,23	0,168	0,129	0,098	0,108	0,137	2,121	3,438	2,223			0,297	570
	0,271	0,193	0,14	0,103	0,112	0,157	2,536	OVRFLW	2,684			0,873	590
	0,07	0,059	0,052	0,05	0,049	0,056	0,322	0,506	0,344	0,083	0,099	0,135	630
	107			108			109			111			
C		0,296		0,234	0,104		0,311		0,269			0,695	570
				0,271	0,237				0,314			0,858	590
	0,095	0,074	0,087	0,068	0,063	0,099	0,081	0,108	0,075	0,104	0,105	0,133	630
D	0,28			0,794				0,516		1,477	0,381	0,564	570
	0,313			0,941				0,732	0,638	1,825	0,685	0,607	590
	0,071	0,089	0,092	0,138	0,099	0,086	0,118	0,128	0,124	0,247	0,116	0,116	630
	143			131			134			135			
E		1,668	1,901	0,968	2,297	0,719	3,466		0,116	0,212	0,211	0,112	570
		1,966	2,126	1,181	2,716	0,876	OVRFLW	0,694	0,129	0,235	0,325	0,223	590
	0,117	0,271	0,264	0,164	0,348	0,146	0,553	0,116	0,052	0,067	0,071	0,06	630
F	0,509	1,587	0,868	2,967	1,001	2,952	0,679	0,695	0,234			2,492	570
	0,673	1,835	1,011	3,673	1,191	3,62	0,805	0,72	0,29		0,237	3,185	590
	0,108	0,236	0,158	0,447	0,177	0,447	0,128	0,116	0,069	0,078	0,062	0,377	630
	136			137						Kontrola média			
G	1,894	1,896	0,925	0,202	0,391	1,012	0,537	0,994	0,416	0,155	OVRFLW	0,945	570
	2,275	2,253	1,096	0,326	0,66	1,212	0,607	1,13	0,483	0,177	OVRFLW	1,124	590
	0,391	0,309	0,159	0,083	0,113	0,171	0,1	0,169	0,09	0,053	0,65	0,157	630
H	2,72	2,563	0,272			0,274	0,6	0,654	1,448	0,116	2,113	1,513	570
	3,246	3,051	0,315			0,319	0,712	0,775	1,729	0,131	2,516	1,794	590
	0,415	0,366	0,068	0,092	0,101	0,072	0,114	0,127	0,23	0,05	0,304	0,23	630

Podmínky: měření v jamičkách; původní OD = 0,1; mód: „Shaking“

Tabulka 17: Zařazení použitých bakteriálních izolátů do kategorií dle schopnosti formovat biofilm

Označení	Bakterie	Průměrná OD ₍₆₅₀₎	OD ₍₆₅₀₎ po odečtení kontroly média	Kategorie
70-2016	<i>Staphylococcus hominis</i>	0,0712	-0,0155	Netvoří biofilm
73-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,0497	-0,0370	Netvoří biofilm
74-2016	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,4262	0,3395	Středně silný producent
106-2016	<i>Staphylococcus hominis</i>	0,1013	0,0147	Netvoří biofilm
107-2016	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,0847	-0,0020	Netvoří biofilm
108-2016	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,0922	0,0055	Netvoří biofilm
109-2018	<i>Staphylococcus hominis</i>	0,1057	0,0190	Netvoří biofilm
111-2016	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0,1368	0,0502	Netvoří biofilm
131-2016	<i>Staphylococcus aureus</i> – MRSA	0,2882	0,2015	Středně silný producent
134-2016	<i>Staphylococcus aureus</i> – MRSA	0,1723	0,0857	Netvoří biofilm
135-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,1192	0,0325	Netvoří biofilm
136-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,2847	0,1980	Středně silný producent
137-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,1053	0,0187	Netvoří biofilm

V Tabulce 19 jsou uvedeny hodnoty absorbance naměřené u první poloviny klinických izolátů, tedy výsledky z první mikrotitrační destičky. Pouze u 3 kmenů byla prokázána schopnost formovat biofilm. Tři kmeny (74-2016 *Staphylococcus capitis*, 131-2016 *Staphylococcus aureus* – MRSA a 136-2016 *Staphylococcus aureus*) byly kategorizovány jako středně silní producenti.

Výsledky jsou mírným zklamáním. Bylo očekáváno, že právě tyto kmeny odebrané z míst organismu typických pro formaci biofilmu při infekci (cévní a močové katetry, popáleniny atd.) budou *in vitro* a za maximálně vhodných podmínek vytvářet velmi objemné biofilmy. Schopnost formace biofilmu je však specifitou jednotlivých kmenů, výsledky proto nelze přesně predikovat. Vnější nepřesnosti mohly být způsobeny použitím starší, několikrát rozmrazované plazmy.

Velice zajímavý výsledek byl pozorován v jamičkách, kam byly pipetovány suspenze kmene 131-2016 *Staphylococcus aureus* – MRSA.

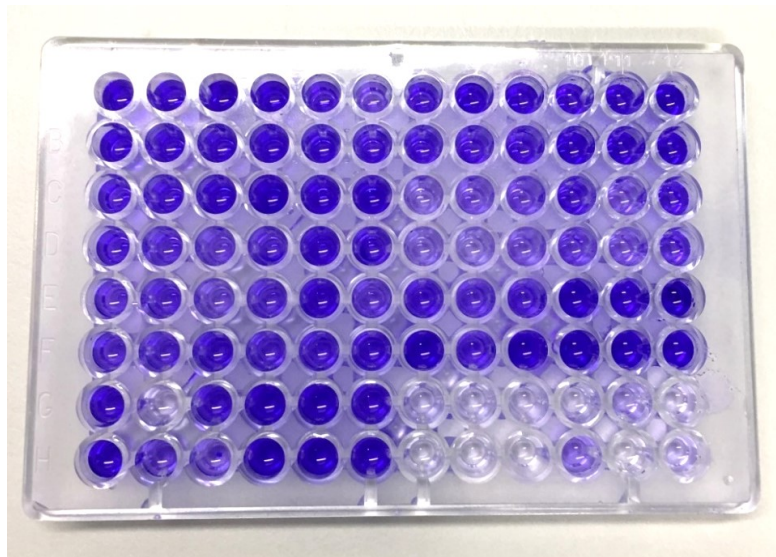
Pravděpodobně již během kryoprezervace zde došlo ke kontaminaci bakterií *Serratia marcescens* – pohyblivou Gram negativní tyčkou způsobující infekce u imunosuprimovaných jedinců, často formou nozokomiální nákazy. Kontaminace byla velice zřejmá pouhým pohledem. Kolonie bakterie *Serratia* oplývají výraznou oranžovou barvou. S nažloutlou bakterií *Staphylococcus aureus* je tedy nezaměnitelná. Kapitola 6.1.3.1. Teoretické části práce obsahuje informaci týkající se rozdělování biofilmů na jednodruhová a vícedruhová společenstva. Směsné biofilmy bývají objemnější. Je tedy otázkou, zdali v jamičce nedošlo k formaci biofilmu dosahujícího uspokojivé střední velikosti právě díky přítomnosti kontaminující bakterie.

Mikrotitrační destička 2

Tabulka 18: Hodnocení schopnosti formace biofilmu klinických izolátů bakterie *Staphylococcus aureus*; naměřené hodnoty absorbance pro kmen s daným číselným označením

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	138			139			140			141		
A	3,329	2,12	OVRFLW	2,524	1,402	0,715	1,55	2,818	2,142	1,821	2,182	3,68
	OVRFLW	2,546	OVRFLW	3,062	1,684	0,854	1,866	3,346	2,568	2,205	2,621	OVRFLW
	0,512	0,33	0,893	0,398	0,227	0,137	0,261	0,438	0,334	0,284	0,356	0,561
B	2,092	1,871	1,611	1,963	1,522	1,263	1,422	1,299	1,424	2,583	2,251	2,538
	2,567	2,253	1,983	2,354	1,865	1,537	1,718	1,558	1,711	3,131	2,724	3,048
	0,331	0,316	0,27	0,307	0,267	0,22	0,236	0,217	0,232	0,397	0,365	0,42
	144			148			149			150		
C	1,332	1,457	1,889	3,208	2,017	3,001	0,945	0,825	0,728	1,39	0,72	1,437
	1,615	1,743	2,322	3,855	2,403	3,563	0,937	0,976	0,869	1,689	0,72	1,739
	0,225	0,255	0,297	0,495	0,32	0,506	0,094	0,155	0,141	0,244	0,123	0,241
D	1,38	1,012	0,757	0,857	1,745	1,185	0,455	0,344	0,353	0,813	0,733	1,007
	1,624	1,213	0,911	1,044	2,105	1,39	0,599	0,694	0,672	0,976	0,731	1,211
	0,235	0,186	0,142	0,176	0,282	0,211	0,105	0,088	0,117	0,151	0,123	0,18
	151			152			153			154		
E	0,918	1,145	0,755	0,908	1,866	0,752	1,373	0,936	1,185	3,82	2,69	OVRFLW
	1,109	1,35	0,748	1,125	2,243	0,931	1,639	1,126	1,412	OVRFLW	3,168	OVRFLW
	0,161	0,21	0,128	0,174	0,302	0,14	0,228	0,167	0,216	0,612	0,406	0,681
F	1,052	1,088	1,359	1,043	1,247	1,401	3,777	1,341	3,57	OVRFLW	3,733	3,712
	1,255	1,267	1,656	1,215	1,514	1,801	OVRFLW	1,598	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW
	0,179	0,172	0,237	0,181	0,21	0,248	0,591	0,226	0,532	0,666	0,613	0,597
	205			143								
G	1,85	0,161	1,546	2,59	3,031	1,762	0,185	0,185	0,185	0,142	0,317	0,10
	2,254	0,192	1,853	3,074	3,517	2,16	0,211	0,174	0,181	0,163	0,396	0,208
	0,29	0,057	0,241	0,385	0,442	0,29	0,064	0,064	0,058	0,055	0,087	0,063
H	2,537	0,927	0,864	3,283	3,333	2,635	0,117	0,129	0,112	0,591	0,115	0,243
	3,062	1,122	0,968	3,881	3,936	3,159	0,134	0,14	0,126	0,601	0,134	0,279
	0,381	0,159	0,257	0,493	0,503	0,456	0,052	0,057	0,05	0,12	0,052	0,071

Tabulka 20 zahrnuje měřené absorbance při vlnové délce 630 nm, tentokrát pro druhou polovinu klinických izolátů. Kontrola média se nachází v jamkách G10-12 a H10-12. Kategorizace izolátů probíhala obdobně dle Tabulky 17.



Obrázek 20: Snímek mikrotitrační destičky po obarvení biofilmu krystalovou violetí a po následné extrakci (A. Diepoltová, 2018)

Tabulka 21 kategorizuje druhou polovinu klinických izolátů do skupin dle schopnosti tvorby biofilmu. Příprava druhé destičky byla prováděna s novou čerstvě rozmraženou prasečí plazmou a již na první pohled je zřejmý výrazný posun (Obrázek 22).

Mezi producenty biofilmu bylo kategorizováno 11 kmenů. Jediný kmen 149-2016 *Staphylococcus aureus* biofilm nevytvořil. Do skupiny „Slabý producent“ byly zařazeny 4 kmeny (144-2016, 150-2016, 151-2016 a 152-2016).

Tabulka 19: Zařazení použitých bakteriálních izolátů do kategorií dle schopnosti formovat biofilm

Označení	Bakterie	Průměrná OD ₍₆₅₀₎	OD ₍₆₅₀₎ po odečtení kontroly média	Kategorie
138-2016	<i>Staphylococcus aureus</i> – MRSA	0,442	0,3673	Silný producent
139-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,2593	0,1847	Středně silný producent
140-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,2863	0,2117	Středně silný producent
141-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,3972	0,3225	Silný producent
144-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,2233	0,1487	Slabý producent
148-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,3317	0,257	Středně silný producent
149-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,1167	0,042	Netvoří biofilm
150-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,177	0,1023	Slabý producent
151-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,1812	0,1065	Slabý producent
152-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,2092	0,1345	Slabý producent
153-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,3267	0,252	Středně silný producent
154-2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5958	0,5212	Silný producent

Mezi nejsilnější producenty dle Tabulky 21 patří kmeny (138-2016, 141-2016 a 154-2016). Již na fotografii destičky (Obrázek 22) či v Tabulce 20 si lze povšimnout, že je barva extrahované krystalové violeti v jamkách s těmito kmeny nejvýraznější. Ve dvou případech se jedná o bakterii *Staphylococcus aureus*, dva další jsou methicilin-rezistentní stafylokoky.

8. DISKUZE

Problematika biofilmů je v současnosti velmi aktuálním tématem v mikrobiologii, klinice i farmakologii. Obtíže, které přítomnost biofilmu v organismu pacienta při infekčním onemocnění přináší, stále komplikují a prodlužují jeho léčbu a rekonvalescenci. Eradikace biofilmu je složitým a nesnadným úkolem pro několik kategorií odborníků. Z klinického hlediska je možné některé biofilmy odstranit invazivními a jinak riskantními chirurgickými zákroky, farmakologové musí počítat s nekonzistentní rezistencí proti různým antibiotikům u biofilmů různých bakteriálních druhů, dokonce kmenů. Zároveň celý problém komplikuje současný stav nadužívání antibiotik a jejich nesprávná preskripce.

Pro navržení nových postupů k odstranění biofilmu je třeba podrobného zkoumání jeho architektury, složení, vnitřních molekulárních dějů, mechanismů resistance, procesu buněčné adheze, maturace apod. Pro bližší pozorování biofilmu je výhodné, když jej dokážeme kontrolovaně „vypěstovat“ v *in vitro* podmínkách tak, aby se co nejvíce podobal *in vivo* situaci.

Cílem této práce bylo zavést model pro formaci stafylokokových biofilmů *in vitro*, prostřednictvím kterého bude možné provádět screening anti-biofilmové aktivity kandidátních antimikrobních látek. Jedním z kladených požadavků na námi volený model vhodný pro testování je relativně nízká finanční zátěž.

V rámci metodiky bylo využito analogického metodického přístupu, který je volen v TCBD, tedy v systému složeném z 96 jamkové mikrotitrační destičky a víčka s inkorporovanými kolíčky. Třebaže je tento model běžně používán, z našeho úhlu pohledu je pro účely screeningu anti-biofilmové aktivity nevhodný

z důvodu vysoké ceny.

Klíčovou část naší experimentální práce tvořila optimalizace podmínek vedoucích k nárůstu masivních stafylokokových biofilmů. Stafylokoky patří mezi známé producenty biofilmu a díky tomu jsou také významnou klinickou hrozbou. Infikují tkáň pacienta i zdravotnické pomůcky a nástroje. Způsobují těžko léčitelná onemocnění a nozokomiální nákazy, jejichž odstranění vyžaduje celý systém opatření.

V Experimentu 1 byla za různých kultivačních podmínek sledována formace biofilmu u tří volených kmenů bakterie rodu *Staphylococcus*: *Staphylococcus aureus*, *methicilin-rezistentní Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*. Zvolený kmen bakterie *Staphylococcus epidermidis* posloužil v naší práci jako referenční kmen, jelikož je v odborných publikacích zmiňován jako ověřený silný biofilmový producent (de Oliveira *et al.*, 2016; Post *et al.*, 2017). Další dva zvolené kmeny jsou schopny biofilm vytvořit, jejich biofilmový fenotyp však není jednotně uváděn.

V rámci Experimentu 1 byly optimalizovány tři základní parametry: volba vhodného kultivačního média, volba vhodné denzity počáteční bakteriální suspenze a kultivace za stálého třepání či bez třepání. Nejvhodnější kombinace podmínek byla poté použita k určení biofilmového fenotypu klinických izolátů bakterie *Staphylococcus spp.*

Pro optimalizaci byla využita tři kultivační média. Kromě základního Soyabean bujónu bylo užito médium suplementované hovězím fetálním sérem, respektive prasečí plazmou. V současnosti je dostupné nepřeberné množství odborných publikací zaměřených na stafylokokové biofilmy, jež uvádí různé metodické přístupy vedoucí k formaci biofilmu *in vitro*. Biofilmy jsou formovány na rozličné typy povrchů (polystyren, polypropylen, nerezová ocel, silikon, polykarbonát apod.) (Williams *et al.*, 2018). Podobně je tomu i v případě volby kultivačního média. Stafylokokové biofilmy jsou na substráty formovány v prostředí médií jako je Mueller-Hinton bujón (Petit *et al.*, 2005), minimální růstové médium suplementované glukózou (Ursic *et al.*, 2008), mozko-srdcové infuzi (Sing *et al.*, 2017) atd. Nejvíce používaným médiem se ovšem zdá být tzv. „tryptic soy“ médium, což je složením shodné médium s médiem Soyabean, jde pouze o rozdílné označení (Kwasny *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2014; Dastgheyb *et al.*, 2015).

Pro námi volný model jsme vycházeli především z publikace Chen *et al.*, 2012, ve které se autoři rovněž zabývají vlivem média na formování biofilmů u bakterie *Staphylococcus aureus*. Z jejich studie jednoznačně vyplývá, že v tekutých médiích, v jejich případě v mozko-srdcové infuzi a tryptic soy médiu suplementovaných lidskou plazmou, dochází k tvorbě celkově větší biomasy u většího počtu biofilm formujících mikroorganismů (Chen *et al.*, 2012).

V otázce volby suplementace základního média vykazují publikace poměrně nekonzistentní výsledky. Fetální bovinní sérum bylo použito s úspěchem například v rámci adhezní esej autorů Valle *et al.*, 2012. Ueno *et al.*, 2016 využili k inkubaci biofilmu na hydroxyapatitem potažených titanových deskách dokonce 100% inaktivované fetální bovinní sérum (Ueno *et al.*, 2016). Naopak, autoři Abraham a Jefferson ve své práci jasně prokázali biofilm-inhibiční vlastnosti lidských nízkomolekulárních sérových proteinů (Abraham et Jefferson, 2010). V rámci naší studie se FBS dle statické analýzy rovněž ukázalo jako ne příliš vhodné, a to nejen v porovnání suplementace plazmou, ale také ve srovnání s čistým základním médiem (Graf 3 Experimentu 1).

Za výhodu u fetálního bovinního séra můžeme považovat nepřítomnost proteinů komplementu, které by mohly buňky lyzovat. V plazmě je ale možné nežádoucí komplement termicky inaktivovat (kapitola 7.1.3.2. Experimentální části). Jako příznivá se však ukazuje přítomnost jiných plazmatických bílkovin. Zdá se totiž, že ty iniciaci adheze bakteriálních buněk k povrchu naopak podporují (Wagner *et al.*, 2011; Cardile *et al.*, 2017). V Teoretické části naší práce (kapitola 6.3.4.) je zmíněno, že stafyloky využívají při procesu adheze některé lidské bílkoviny také *in vivo*, při patogenezi s biofilmem spojených infekcí (Neopane *et al.*, 2018). Přítomnost plazmatických bílkovin *in vitro* je tedy pravděpodobně velkou výhodou. I v naší práci se ukázalo použití suplementace plazmy jako výhodné v porovnání s užitím čistého základního média či suplementace FBS.

Zcela neočekávané výsledky jsme získali v rámci studia formace biofilmu na kolíčcích, jenž jsou součástí víčka destičky. V našem případě výsledky kolidovaly s daty získanými pozorováním formování stafylokokových biofilmů v jamkách mikrotitrační destičky. Je třeba si přiznat, že námi volené víčko je tvořeno z odlišného materiálu, než nabízí systém TCBD. Zatímco v metodice TCBD se užívá kolíčků polystyrenových, v rámci našeho experimentu bylo

k dispozici víčko polypropylenové. Ač se tento materiál pro studium formace biofilmu běžně používá (da Silva Meira *et al.*, 2012; de Souza *et al.*, 2014), na základě našich získaných dat bohužel nelze kolíčků v této podobě (pro formování biofilmů v našem experimentu a následně při testování antimikrobních aktivit kandidátních látek) využít. Další experimentální práce však počítá s coatingem kolíčků čili potažením jejich povrchu tak, aby byla usnadněna adheze stafylokoků na povrch.

Testované byly také různé optické denzity počáteční bakteriální suspenze. V publikacích najdeme znovu velmi rozličné přístupy. Manner *et al.* suspendovali ve svém experimentu 1 μ l bakteriální kolonie ve 3 ml Soyabean média. Optická denzita suspenze dále měřena nebyla (Manner *et al.*, 2017). Rodríguez-Lázaro *et al.* připravili suspenzi z jedné větší bakteriální kolonie v Soyabean médiu a následně ji upravili tak, aby odpovídala optické denzitě 1 (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2018). Na základě statistické analýzy jsme však, jako pro náš model nejvhodnější suspenzi, zvolili suspenzi o OD 0,1. Metodika vzorového systému TCBD doporučuje zvláštní ředění z výchozí suspenze OD = 1. Nicméně, výsledky nárůstu biofilmu našeho referenčního kmene bakterie *Staphylococcus epidermidis* nebyly při tomto ředění uspokojivé (Graf 5). Překvapením zde byl však také velmi pozitivní efekt samotného Soyabean média v porovnání s většinou efektivnějším médiem Soyabean+PP. Vzhledem k nekonzistenci výsledků bude pravděpodobně nutné toto měření pro další práci zopakovat.

Formace biofilmu je podporována přítomností okolního média a také jeho pohybem. Pozorováním vlivu míchání při inkubaci byla ověřena naše domněnka, že nepohyblivé stafylokoky snáze doputují ke dnu a stranám jamky právě za pomoci třepání. Tím byla i podpořena snaha, co nejbliže se přiblížit *in vivo* podmínkám. Biofilmy totiž často vznikají na velmi „rušných“ místech, například v blízkosti tekoucí kapaliny. S mícháním pracovali například autoři výše zmíněné práce sledující faktory prevence vzniku stafylokokových biofilmů (Manner *et al.*, 2017). Bez míchání se obešli autoři porovnávající metody detekce biofilmů formovaných stafylokoky izolovanými z mléka krav nakažených mastitidou. Bakterie inkubovali v Soyabean médiu obohaceném glukózou (de Castro Melo *et al.*, 2013). Formaci biofilmů v naší práci třepání dle statisticky zpracovaných dat prospívalo (Graf 6).

Kombinace podmínek, jež zapříčinila maximální formaci biomasy u tří

testovaných kmenů, byla aplikována při inkubaci klinických izolátů v druhé části experimentu. Tvorba biofilmu je vlastností jednotlivých kmenů, jejich chování tudíž nelze predikovat.

Kmeny byly řazeny do 4 kategorií („Netvoří biofilm“, „Slabý producent“, „Středně silný producent“, „Silný producent“). Všechny kmeny se podařilo kategorizovat. Vhodné ověřené podmínky mohou být aplikovány v nových experimentech při inkubaci dalších kmenů bakterií a ač nebylo silných producentů zařazeno mnoho, mohou být, právě tyto konkrétní kmeny, využity k testování nově syntetizovaných antimikrobních látek a tím snad alespoň částečně přispět k rozuzlení komplexního problému souvisejícího s tematikou biofilmu.

9. ZÁVĚR

a) Experiment 1

- Inspirací pro experiment byla metodika The Calgary Biofilm Device.
- V Experimentu 1 byla testována schopnost formovat biofilm u tří kmenů bakterie rodu *Staphylococcus* za různých podmínek.
- Byly voleny komerčně dostupné biofilm formující kmeny *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213, 142-2016), *methicilin-rezistentní Staphylococcus aureus* (ATCC 43300, 143-2016) s neznámým biofilmovým fenotypem a kmen *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35983, 205-2018) s biofilmovým fenotypem deklarovaným jako silný biofilmový producent.
- Pozorované podmínky sestávaly z tří různých médií, dvou módů inkubace („Shaking“/„Without shaking“), tří optických denzit počáteční suspenze a místa formace biofilmu (jamička mikrotitrační destičky/kolíček víčka).

- Na základě statistického hodnocení bylo jako nejvhodnější médium k formaci biofilmu zvoleno Soyabean medium suplementované prasečí plazmou.
- Nejpříznivějším módem inkubace byl mód „Shaking“- tedy míchání.
- Nejkonzistentnější výsledky vykazovala počáteční bakteriální suspenze o OD 0,1.
- Kolíčky nejsou v rámci našeho modelu pro formaci biofilmu vhodné. Problém pravděpodobně spočívá v nevhodném povrchu.
- Vhodným místem ke vzniku biofilmu je jamička mikrotitrační destičky.
- Bylo prokázáno, že za určitých podmínek jsou všechny tři použité kmeny schopné formace biofilmu *in vitro*.
- Nejvhodnější kombinace podmínek podporující maximální nárůst biomasy stafylokokového biofilmu byla aplikována v Experimentu 2.

b) Experiment 2

- Klinické izoláty bakterie rodu *Staphylococcus* byly na základě schopnosti tvorby biofilmu řazeny do 4 kategorií.
- Středně silní a silní producenti biofilmu budou využity pro další experimenty k formaci dostatečně masivního biofilmu pro testování kandidátních antimikrobních látek určených k jejich eradikaci.

10. SEZNAM GRAFŮ, OBRÁZKŮ, SCHÉMAT A TABULEK

GRAFY

Graf 1: Procentuální zastoupení původců onemocnění CRBSI.....	28
Graf 2: Porovnání vlivu média.....	63
Graf 3: Porovnání vlivu média 2.....	64
Graf 4: Porovnání vlivu média 3.....	65
Graf 5: Porovnání vlivu původní optické denzity.....	66
Graf 6: Porovnání módu inkubace.....	67

OBRÁZKY

Obrázek 1: Místa iritovaná nežádoucí formací biofilmu.....	14
Obrázek 2: Architektura biofilmu.....	17
Obrázek 3: Proces formace a disperze biofilmu.....	18
Obrázek 4: Základní mechanismy rezistence buněk biofilmu.....	21
Obrázek 5 VLEVO: SEM snímek bakterie Staphylococcus aureus.....	22
Obrázek 6 VPRAVO: Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis ...	22
Obrázek 7: Fotografie biofilmu na kosti ze SEM.....	25
Obrázek 8: Fotografie cévního katetru.....	29
Obrázek 9: Fotografie močového katetru.....	31
Obrázek 10: Fotografie mikrotitrační destičky.....	34
Obrázek 11: Dvě varianty modelového systému TCBD.....	35
Obrázek 12: Kolíčky systému TCBD upravené hydroxyapatitem.....	36
Obrázek 13: Princip chemostatu.....	38
Obrázek 14: CDC biofilm reaktor.....	38
Obrázek 15: Snímky pořízené prostřednictvím CLSM.....	40
Obrázek 16: Snímek z epifluorescenční mikroskopie.....	42
Obrázek 17: Snímek z epifluorescenční mikroskopie.....	43
Obrázek 18: Mikrotitrační TCBD destička s 96 jamkami a víčko s kolíčky.....	46
Obrázek 19: Petriho misky na MHA.....	48
Obrázek 20: Snímek mikrotitrační destičky.....	51
Obrázek 21: Snímky bakteriálních kolonií narostlých na MHA.....	70
Obrázek 22: Mikrotitrační destička po obarvení biofilmu krystalovou violetí	76

SCHÉMATA

Schéma 1: Schéma průtokové komory.....	37
Schéma 2: Sledované podmínky Experimentu 1.....	45
Schéma 3: Schéma zaočkování mikrotitračních destiček.....	51
Schéma 4: Členění práce na Experimentu 1.....	53
Schéma 5: Mikrotitrační destička 1.....	71
Schéma 6: Mikrotitrační destička 2.....	71

TABULKY

Tabulka 1: Použité bakteriální kmeny	48
Tabulka 2: Naměřené hodnoty absorpance	54
Tabulka 3: Kategorizace kmenů bakterií dle schopnosti tvořit biofilmy	55
Tabulka 4: Měření v jamičkách; původní OD = 0,1; mód: „Shake“ $\lambda = 630$ nm	55
Tabulka 5: Měření v jamičkách; původní OD = 0,5; mód: „Shake“; $\lambda = 630$ nm	56
Tabulka 6: Měření v jamičkách; původní OD = 1; mód: „Shake“; $\lambda = 630$ nm	56
Tabulka 7: Měření v jamičkách; původní OD = 0,1; mód: „WO“; $\lambda = 630$ nm	57
Tabulka 8: Měření v jamičkách; původní OD = 0,5; mód: „WO“; $\lambda = 630$ nm	57
Tabulka 9: Měření v jamičkách; původní OD = 1; mód: „WO“; $\lambda = 630$ nm	58
Tabulka 10: Měření na kolíčkách; původní OD = 0,1; mód: „Shake“; $\lambda = 630$ nm	58
Tabulka 11: Měření na kolíčkách; původní OD = 0,5; mód: „Shake“; $\lambda = 630$ nm	59
Tabulka 12: Měření na kolíčkách; původní OD = 1; mód: „Shake“; $\lambda = 630$ nm	59
Tabulka 13: Měření na kolíčkách; původní OD = 0,1; mód: „WO“; $\lambda = 630$ nm	60
Tabulka 14: Měření na kolíčkách; původní OD = 0,5; mód: „WO“; $\lambda = 630$ nm	60
Tabulka 15: Měření na kolíčkách; původní OD = 1; mód: „WO“; $\lambda = 630$ nm	61
Tabulka 16: Použité klinické izoláty s místem odběru	69
Tabulka 17: Kategorizace klinických izolátů bakterií	73
Tabulka 18: Hodnocení schopnosti formace biofilmu 1	73
Tabulka 19: Zařazení použitých bakteriálních izolátů 1	74
Tabulka 20: Hodnocení schopnosti formace biofilmu 2	75
Tabulka 21: Zařazení použitých bakteriálních izolátů 2	76

11. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

ABRAHAM, N.; JEFFERSON, K. K. *A low molecular weight component of serum inhibits biofilm formation in Staphylococcus aureus* [online]. 2010, *Microb Pathog.* 49(6): 388–391. [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1016/j.micpath.2010.07.005. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2956848/>

AINSCOW D. A. P; DENHAM, R. A. The risk of hematogenous infection in total joint replacements. *The Bone & Joint Journal.* 66(4):580-2 [online]. Zář 1984, [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1302/0301-620X.66B4.6430907. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/16765213_The_risk_of_hematogenous_infection_in_total_joint_replacements, převzato z abstraktu databáze ResearchGate.net

ALIJANIPOUR, P.; HELLER, S.; PARVIZI, J. *Prevention of Periprosthetic Joint Infection: What Are the Effective Strategies?* [online]. 2014, *J Knee Surg.* 27(04): 251-258 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1055/s-0034-1376332. Dostupné z: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0034-1376332>, převzato z abstraktu Thieme – The journal of knee surgery

ARCHER N. K.; MAZAITIS M.J.; COSTERTON, J.W. *et al. Staphylococcus aureus biofilms, properties, regulation, and roles in human disease* [online]. Zář–ř 2011, *Virulence.* 2(5):445-59. [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.4161/viru.2.5.17724. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21921685>

ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; RAVAIOLI, S. *et al. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects* [online]. Únor 2015, *Front Cell Infect Microbiol.* 5: 7.str. 1-10, [cit. 2019-03-18]. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00007. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4322838/>

ARBER, N.; PRAS. E.; COPPERMAN, Y. *et al. Pacemaker endocarditis. Report of 44 cases and review of the literature.* [online]. Listopad 1994, *Medicine (Baltimore).* 73(6):299-305. [cit. 2019-03-17]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984081>

BANNERT, N., MADELA, K. *Staphylococcus aureus. Scanning electron microscopy.* [online]. Listopad 2014 [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: https://www.rki.de/EN/Content/infections/Diagnostics/NatRefCentresConsultantLab/CONSULAB/EM-images/EM_Tab_Staphylokokken_en.html

BAILEY, William C. *Biofilms: formation, development and properties.*, Pavarina et al.: Chapter 3 - Dynamic Models for In Vitro Biofilm Formation. New York: Nova Science Publishers. 2011. [cit. 2019-03-30]. *Biotechnology in agriculture, industry and medicine series.* ISBN 978-1-61728-293-5.

- BANU, A.; NOORUL HASSAN, M.M.; RAJKUMAR, J. *et al.* *Spectrum of bacteria associated with diabetic foot ulcer and biofilm formation: A prospective study*. [online]. Zář 2015, Australas Med J. 30;8(9):280-5 [cit. 2019-03-29]. DOI: 10.4066/AMJ.2015.2422. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26464584>
- BARAKAT, H.S; KASSEM, M.A.; EL-KHORDAGUI, L.K. *et al.* *Vancomycin-Eluting Niosomes: A New Approach to the Inhibition of Staphylococcal Biofilm on Abiotic Surfaces* [online]. 2014, PharmSciTech. 15(5): 1263–1274 AAPS [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1208/s12249-014-0141-8. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4179651/>
- BEDNÁŘ, M.; FRAŇKOVÁ, V.; SCHINDLER, J. *et al.* *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. TRITON, 1996, s. 193-194. ISBN 8594031505280.
- BERLANGA, M., GUERRERO, R. *Living together in biofilms: The microbial cell factory and its biotechnological implications* [online]. Prosinec 2016, Microbial Cell Factories. 15(1) [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.1186/s12934-016-0569-5. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/308865119_Living_together_in_biofilms_The_microbial_cell_factory_and_its_biotechnological_implications
- BioSurface Technologies Corporation: *CDC Biofilm Reactor® (CBR) Operator's Manual* [online]. 2019, 1-16 [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: <https://biofilms.biz/products/biofilm-reactors/cdc-biofilm-reactor/>
- BISPO, P. J. M.; HAAS, W.; GILMORE M.S. *Biofilms in Infections of the Eye* [online]. Březen 2015, Pathogens. Mar; 4(1): 111–136. [cit. 2019-03-28]. DOI: 10.3390/pathogens4010111. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4384075/>
- BONNET, R. *Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes* [online]. 2004, Antimicrob Agents Chemother. 48(1): 1–14. [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1128/AAC.48.1.1-14.2004. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC310187/>
- BROOUN, A.; LIU, S.; LEWIS, K. *A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in Pseudomonas aeruginosa Biofilms* [online]. Březen 2000, Antimicrob Agents Chemother. 44(3): 640–646. [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89739/>
- CARDILE, A. P.; SANCHEZ, C. J.; SAMBERG, M. E. *Human plasma enhances the expression of Staphylococcal microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules promoting biofilm formation and increases antimicrobial tolerance In Vitro* [online]. 2017, BMC Res Notes. 7: 457. [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1186/1756-0500-7-457. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4110374/>
- de CASTRO MELO, P.; MENEZES FERREIRA, L.; NADER FILHO, A. *et al.* *Comparison of methods for the detection of biofilm formation by*

Staphylococcus aureus isolated from bovine subclinical mastitis [online]. 2013, Brazilian Journal of Microbiology. vol.44 no.1 [cit. 2019-05-02]. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822013005000031>. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822013000100017

CERI, H.; OLSON, M.E.; STREMICK, C. *et al.* *The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms* [online]. Červen 1999, J Clin Microbiol. 37(6):1771-6 [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10325322>

CHEN, P.; ABERCROMBIE, J.J.; JEFFREY, N.R., *et al.* *An improved medium for growing Staphylococcus aureus biofilm* [online]. 2012, Journal of Microbiological Methods. 90 (2012) 115–118 [cit. 2019-03-23]. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.04.009. Dostupné z: <https://apps.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/a618459.pdf>

CHEN, J. T.; CHEN, R. M.; LIN, Y.L. *et al.* *Confocal laser scanning microscopy: I. An overview of principle and practice in biomedical research* [online]. Duben 2004, Acta Anaesthesiologica Taiwanica. 42(1):33-40 [cit. 2019-03-31]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/8556904_Confocal_laser_scanning_microscopy_I_An_overview_of_principle_and_practice_in_biomedical_research

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL D.E. *et al.* *Microbial biofilms* [online]. 1995, Annu Rev Microbiol. 49:711-45. [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8561477>

CRUSZ S.A.; POPAT, R.; RYBTKE, M.T. *et al.* *Bursting the bubble on bacterial biofilms: a flow cell methodology* [online]. Zář 2012, Biofouling. 28(8): 835–842. [cit. 2019-03-30]. DOI: 10.1080/08927014.2012.716044. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3438488/>

DASTGHEYB, S.; PARVIZI, J.; SHAPIRO, I.M. *et al.* *Effect of Biofilms on Recalcitrance of Staphylococcal Joint Infection to Antibiotic Treatment* [online]. 2015, J Infect Dis. 211(4): 641–650. [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1093/infdis/jiu514. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4318921/>

DONLAN, R.M. *Biofilms: microbial life on surfaces* [online]. Zář 2002, Emerg Infect Dis. 8(9):881-90. [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.3201/eid0809.020063. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12194761>

DURAND M.L. *Endophthalmitis* [online]. Březen 2013, Clin Microbiol Infect. 19(3): 227–234. [cit. 2019-03-28]. DOI: 10.1111/1469-0691.12118. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3638360/>

DYKHUIZEN, D. E.; HARTL, D. L. *Selection in chemostats* [online]. Leden 1983, Microbiol Rev. 47(2): 150–168. [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC281569/>

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC): *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2017* [online]. Listopad 2018, str. 54-55 [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2017>

FENELEY, R. C. L.; HOPLEY I.B.; WELLS, P.N. *Urinary catheters: history, current status, adverse events and research agenda* [online]. 2015, J Med Eng Technol. 39(8):459-7 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.3109/03091902.2015.1085600. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26383168>

FLETCHER, M., LOEB, G.I. *Influence of Substratum Characteristics on the Attachment of a Marine Pseudomonad to Solid Surfaces* [online]. Leden 1979, Appl Environ Microbiol. 37(1): 67–72. [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC243402/>

GAHLOT, R.; NIGAM, C.; KUMAR, V.; YADAV G. et al. *Catether-Related Bloodstream Infection* [online]. 2014, Int J Crit Illn Inj Sci. 4(2) : 162-167 [cit. 2019-03-16]. DOI: 10.4103/2229-5151.134184. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4093967/?report=reader#!po=65.6250>

GBEJUADE H.O.; LOVERING, A.M.; WEBB J.C. *The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections: The Review* [online] *Acta Orthopaedica*. Duben 2015, Acta Orthop. 86(2):147-58. [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.3109/17453674.2014.966290. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25238433>

GILBERT, P.; ALLISON, D.G.; McMAIN, A.J. *Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance?* [online]. 2002, J Appl Microbiol. 92:98S-110S. [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12000619>

GRESHAM, D.; HONG, J. *The functional basis of adaptive evolution in chemostats* [online]. Leden 2015, FEMS Microbiol Rev. 39(1):2-16 [cit. 2019-03-30]. DOI: 10.1111/1574-6976.12082. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25098268>

GUSNANIAR, N.; SJOLLEMA, J.; JONG, E.D. et al. *Influence of biofilm lubricity on shear-induced transmission of staphylococcal biofilms from stainless steel to silicone rubber* [online]. Srpen 2017, Microbial Biotechnology. 10(1) [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1111/1751-7915.12798. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/318893927_Influence_of_biofilm_lubricity_on_shear-induced_transmission_of_staphylococcal_biofilms_from_stainless_steel_to_silicone_rubber

HUSSAIN, M.; HERRMANN, M.; von EIFF, C. et al. *A 140 – Kilodalton Extracellular Protein Is Essential for the Accumulation of Staphylococcus epidermidis Strains on Surfaces* [online]. Únor 1997, Infect Immun. 65(2):

519–524. [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC176090/> citováno z abstraktu databáze PubMed

Innovatech Inc. *MBEC Assay® For High-Throughput Antimicrobial Susceptibility Testing of Biofilms: PROCEDURAL MANUAL Version 2.0* [online]. 2019, 1-21 [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: <http://www.innovotech.ca/products/mbec-assays/>

Institut klinické a experimentální medicíny: Infekční endokarditida. IKEM.cz [online]. [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <https://www.ikem.cz/cs/infekcni-endokarditida/a-433/>

JIROUŠ, J. *Prevence infekcí cévního řečiště spojených s intravaskulární katetrizací* [online]. Říjen 2010 [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: <https://www.sneh.cz/hledej.phtml?ahledat=jirouš%9A>

JOHNSON, M. *Fetal Bovine Serum* [online]. 2012 [cit. 2019-05-02]. DOI: dx.doi.org/10.13070/mm.en.2.117. Dostupné z: <https://www.labome.com/method/Fetal-Bovine-Serum.html>

KIRMUSAOGLU, S. *Staphylococcal Biofilms: Pathogenicity, Mechanism and Regulation of Biofilm Formation by Quorum-Sensing System and Antibiotic Resistance Mechanisms of Biofilm-Embedded Microorganisms* [online]. Červen 2016, str. 196 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.5772/62943. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/microbial-biofilms-importance-and-applications/staphylococcal-biofilms-pathogenicity-mechanism-and-regulation-of-biofilm-formation-by-quorum-sensin>

KŘÍKAVA, I., ŠEVČÍK, P. Možnosti antimikrobiální ochrany centrálních žilních katétrů. *Anesteziologie a intenzivní medicína*. Praha: ČLS JEP. ISSN: 1214-2158. 2008. roč. 19, č. 4, s. 210–217 [cit. 2019-03-31].

KWASNY, S. M.; OPPERMAN, T. J. *Static biofilm cultures of Gram-positive pathogens grown in a microtiter format used for anti-biofilm drug discovery* [online]. 2010 *Curr Protoc Pharmacol*. 50: 13A.8.1–13A.8.23. [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1002/0471141755.ph13a08s50. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3272335/>

LEBEAUX, D.; CHAUHAN, A.; RENDUELES, O. *et al. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections* [online]. Květen 2013, *Pathogens*. 13;2(2):288-356. [cit. 2019-03-30]. DOI: 10.3390/pathogens2020288. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25437038>

LEBEAUX, D.; GHIGO, J.M.; BELOIN C. *Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics* [online]. Zář 2014, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 510–543 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1128/MMBR.00013-14. Dostupné z: <https://mmbbr.asm.org/content/78/3/510.full>

- LEE, S.; CHOI, K-H.; YOON, Y. *et al. Effect of NaCl on Biofilm Formation of the Isolate from Staphylococcus aureus Outbreak Linked to Ham* [online]. 2014, Korean J Food Sci Anim Resour. 34(2): 257–261. [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.5851/kosfa.2014.34.2.257. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4597839/>
- LEWIS, K. *Riddle of biofilm resistance* [online]. Duben 2001, Antimicrob Agents Chemother. 45(4):999-1007. [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257008>
- LHOTSKÝ, J.: Úvod do studia symbiotických interakcí mikroorganismů, nový pohled na viry a bakterie, 2015. První vydání. Praha: nakladatelství Academia, 207 s., ISBN 978-80-200-2480-0
- LI, X.; ZHENG, L.; HUANG L.; ZHENG, O. *et al. Adsorption Removal of Crystal Violet from Aqueous Solution Using a Metal-Organic Frameworks Material, Copper Coordination Polymer with Dithiooxamide* [online]. Únor 2013 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1002/app.39009. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.39009>
- MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. *Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents* [online]. Leden 2001, Trends Microbiol. 9(1):34-9. [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166241>
- MANNER, S.; GOERES, D.M.; SKOGMAN, M. *et al. Prevention of Staphylococcus aureus biofilm formation by antibiotics in 96-Microtiter Well Plates and Drip Flow Reactors: critical factors influencing outcomes* [online]. 2017, Sci Rep. 7: 43854. [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1038/srep43854. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5333151/>
- MARRAFFINI, L.; DEDENT, A.C.; SCHNEEWIND, O. *Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria* [online]. 2006, Microbiol Mol Biol Rev. 70(1):192-221. [cit. 2019-03-17]. DOI: 10.1128/MMBR.70.1.192–221.2006. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16524923>
- MASON, C.; WAGNER, K.; JACQUES, M. *et al. Screening of cave bacteria for antimicrobial activity against Pseudomonas aeruginosa Biofilms* [online]. Leden 2015, Canadian Society of Microbiologists [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/284450328_Screening_of_cave_bacteria_for_antimicrobial_activity_against_Pseudomonas_aeruginosa_Biofilms
- McLEAN, R.J.; LAM, J.S.; GRAHAM, L.L. *Training the Biofilm Generation--a tribute to J. W. Costerton*. [online]. Červen 2012, J Bacteriol. 194(24):6706-11. [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1128/JB.01252-12. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22961848>

NEOPANE, P.; NEPAL, H.P.; SHRESTHA, R. *et al.* *In vitro* biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance [online]. Leden 2018, nt J Gen Med. 18;11:25-32. [cit. 2019-03-29]. DOI: 10.2147/IJGM.S153268. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29403304>

NIU, C.; GILBERT, E. S. *Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components That Affect Biofilm Formation and Structure* [online]. Prosinec 2004, Appl Environ Microbiol. 70(12):6951-6. [cit. 2019-03-30]. DOI: 10.1128/AEM.70.12.6951-6956.2004. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC535164/>

de OLIVIERA, A.; PEREIRA, V.C.; PINHEIRO, L. *et al.* *Antimicrobial Resistance Profile of Planktonic and Biofilm Cells of Staphylococcus aureus and Coagulase-Negative Staphylococci* [online]. 2016, Int J Mol Sci. 17(9): 1423. [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.3390/ijms17091423. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5037702/>

OTTO, M. *Staphylococcal Biofilms* [online]. 2008, Curr Top Microbiol Immunol. 322:207-28. [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18453278>

PANTOSTI, A.; VENDITTI, M. *SERIES "MRSA AND THE PULMONOLOGIST": What is MRSA?* [online]. 2009, European Respiratory Journal. 34: 1190-1196 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1183/09031936.00007709. Dostupné z: <https://erj.ersjournals.com/content/34/5/1190.abstract>

PEETERS, E.; NELIS, H.J.; COENYE, T. *Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates* [online]. Únor 2008, J Microbiol Methods. 72(2):157-65. [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.11.010. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18155789>

PETERS, B. M.; JABRA-RIZK, M.A.; O'MAY, G.A. *et al.* *Polymicrobial Interactions: Impact on Pathogenesis and Human Disease* [online]. Leden 2012, Clin Microbiol Rev. 25(1): 193–213. [cit. 2019-03-29]. DOI: 10.1128/CMR.00013-11. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3255964/>

PETIT, R.K.; WEBER, C.A.; KEAN, M.J. *et al.* *Microplate Alamar Blue Assay for Staphylococcus epidermidis Biofilm Susceptibility Testing* [online]. 2005, American Society for Microbiology. [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1128/AAC.49.7.2612-2617.2005. Dostupné z: <https://aac.asm.org/content/49/7/2612>

POST, V.; HARRIS, L.G; MORGENSTERN M, *et al.* *Comparative Genomics Study of Staphylococcus epidermidis Isolates from Orthopedic-Device-Related Infections Correlated with Patient Outcome* [online]. Srpen 2017,

American Society for Microbiology. [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1128/JCM.00881-17. Dostupné z: <https://jcm.asm.org/content/55/10/3089>

RAGAZZI, M.; PIANA, S.; LONGO, C. *et al.* *Fluorescence confocal microscopy for pathologists* [online]. Zář 2013, *Modern Pathology*. 27, 460–471 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1038/modpathol.2013.158. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/modpathol2013158>

RISS T., L.; MORAVEC, R.A.; NILES A. N. *et al.* *Cell Viability Assays* [online]. Květen 2013, *Assay Guidance Manual*. 1-31 [cit. 2019-03-31]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/?report=classic>

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; ALONSO-CALLEJA, C.; ONICIUC, E. A. *Characterization of Biofilms Formed by Foodborne Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* [online]. 2018, *Front. Microbiol.* [cit. 2019-05-02]. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03004>. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03004/full>

ROUBALOVÁ, J. *Optimalizace metodiky vedoucí k hodnocení citlivosti biofilm formujících mikrobiálních agens vůči látkám s antimikrobním potenciálem*. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy. Vedoucí práce RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

RULÍK, M.; HOLÁ, V.; RŮŽIČKA, F. *et al.* *Mikrobiální biofilmy*, 2011. První vydání. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 447 s., ISBN 978-80-244-2747-8.

SADOVSKAYA, I.; VINOGRADOV, E.; FLAHAUT, S. *et al.* *Extracellular Carbohydrate-Containing Polymers of a Model Biofilm-Producing Strain, Staphylococcus epidermidis RP62A* [online]. květen 2005, *Infect Immun*. 73(5):3007-17. [cit. 2019-03-18]. DOI: 10.1128/IAI.73.5.3007-3017.2005. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15845508>

SCHINDLER, J.: *Ze života bakterií*, 2008. První vydání. Praha: nakladatelství Academia, 143 s., ISBN 978-80-200-1666-9, s. 61-69

SIGMA-ALDRICH. *Plasma from Porcine-Product Information* [online]. [cit. 2019-05-02]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/P2891?lang=en®ion=CZ&qclid=Cj0KCQiA5NPjBRDDARIsAM9X1GLKf3ry0FMmzUxHAAGbdkWWI13kVOBdEkwoqYpbELKUbqEz kwINCYaAgMnEALw wcb>

da SILVA MEIRA, Q.G.; de MADEIROS BARBOSA, I.; ALVES AGUIAR ATHAYDE *et al.* *Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by Staphylococcus aureus from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers* [online]. 2012, *Food Control*. 25 469-475 [cit. 2019-05-02]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.030>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511005123#!SIN>

- GH, A. K.; PRAKASH, P.; ACHRA, A. *et al.* *Standardization and Classification of In vitro Biofilm Formation by Clinical Isolates of Staphylococcus aureus* [online]. 2017, *Glob Infect Dis*.9(3):93–101 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.4103/jgid.jgid_91_16. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5572203/?report=classic>
- de SOUZA, E.L.; MEIRA Q. G. S.; de MADEIROS BARBOSA, I. *et al.* *Biofilm formation by Staphylococcus aureus from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers* [online]. 2014, PMID: 24948915, *Braz J Microbiol.* 45(1): 67–75. [cit. 2019-05-02]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4059327/>
- TRAUTNER, B.W; DAROUICHE R. O. *Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection* [online]. Květen 2004, *Am J Infect Control.* 32(3): 177–183. [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1016/j.ajic.2003.08.005. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2963581/>
- TONG, S.Y.; DAVIS, J.S.; EICHENBERGER *et al.* *Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management*[online]. červenec 2015, *Clin Microbiol Rev.* 28(3):603-61 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1128/CMR.00134-14. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26016486>
- UENO, M.; MIYAMOTO, H.; TSUKAMOTO, M. *et al.* *Silver-Containing Hydroxyapatite Coating Reduces Biofilm Formation by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus In Vitro and In Vivo* [online]. 2016, *BioMed Research International.* 7 [cit. 2019-05-02]. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8070597>. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/8070597/>
- URSIC, V.; TOMIC, V.; KOSNIK, *et al.* *M. Effect of different incubation atmospheres on the production of biofilm in methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) grown in nutrient-limited medium.* [online]. 2008, *Curr Microbiol.* 57(4):386-90. [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1007/s00284-008-9211-z. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18704578>
- VALLE, J.; LATASA, C.; GIL, C. *et al.* *Bap, a Biofilm Matrix Protein of Staphylococcus aureus Prevents Cellular Internalization through Binding to GP96 Host Receptor* [online]. 2012, *PLoS Pathog.* 8(8) *PLoS Pathog.* 8(8): e1002843. [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002843. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3410863/>
- VANDECANDELAERE, I.; VAN NIEUWERBURGH F.; DEFORCE *et al.* *Metabolic activity, urease production, antibiotic resistance and virulence in dual species biofilms of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus.* Březen 2017, *PLoS One.* 6;12(3 *PubMed* [online]. 2017 [cit. 2019-03-26] DOI: 10.1371/journal.pone.0172700. 2017. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28263995>

WAGNER, C.; AYTAC, S.; HANSCH, G. M. *Biofilm growth on implants: bacteria prefer plasma coats*. [online]. 2011, Int J Artif Organs. 34(9):811-7. [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.5301/ijao.5000061. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094560>

WILLIAMS, D.L.; SMITH, S.R.; PETERSON, B.R. *et al. Growth substrate may influence biofilm susceptibility to antibiotics* [online]. 2018, BioRxiv. [cit. 2019-05-01]. DOI: doi: <http://dx.doi.org/10.1101/449892>. Dostupné z: <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2018/10/22/449892.full.pdf>

YARWOOD, J.M., SCHLIEVERT, P.M. *Quorum sensing in Staphylococcus infections*. [online]. Prosinec 2003, J Clin Invest. 112(11):1620-5 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1172/JCI20442. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14660735>

ZUROFF, T. R.; BERNSTEIN, H.; LLOYD-RANDOLFI *et al. Robustness analysis of culturing perturbations on Escherichia coli colony biofilm beta-lactam and aminoglycoside antibiotic tolerance* [online]. červenec 2010, BMC Microbiol. 7;10:185 [cit. 2019-03-30]. DOI: 10.1186/1471-2180-10-185. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20609240>