



5 Dnešní „civilizace“ se obráží i ve složení náplavů, jak dokládá náplav Dunajce v národním parku Pieniny (!), který pozůstává především z plechovek připravených z „kulturní“ krajiny výše proti proudu. Snímky V. Ložka, pokud není uvedeno jinak

miky proudových koridorů a šíření druhů v krajině, jejich reakce na povodňovou zátěž i znečištění apod., a vůbec poprvé se snažíme tuto dynamiku kvantifikovat. Výzkum měkkýšů v náplavech dosud zdaleka neřekl své poslední slovo a zejména pokud by byl provázen i studiem dalších náplavových objektů, především vytríděných semen, mohl by poskytnout řadu nových poznatků o přírodním dění.

Veronika Holá

Mikrobiální biofilmy

3. Biofilmová společenstva lidského těla a biofilmové infekce

Z celkového množství všech buněk obsažených v lidském těle je těch skutečně lidských pouze desetina (okolo 10^{13}). Celých 90 % tvoří buňky naší přirozené mikrobioty, tedy bakterie (řádově 10^{14}). Velká část z nich se vyskytuje v biofilmu. Na druhou stranu v této formě rostou i bakterie patogenní, způsobující onemocnění různých orgánů a orgánových soustav. Biofilm jako forma existence mikrobů je tedy z pohledu medicíny velmi důležitý. Mikroorganismy v biofilmu se totiž vyznačují zvýšenou odolností vůči obranným mechanismům hostitele a schopnost růstu bakterií v biofilmu je též spojována s vysokou přirozenou rezistencí těchto společenstev k účinkům antibiotik, což se z hlediska klinické mikrobiologie považuje za důležitý faktor virulence společný všem biofilmům. Biofilmy se tak pro svou schopnost přichytit se k povrchům implantovaných chirurgických náhrad a zařízení nebo k poškozeným tkáním mohou stát příčinou přetrvávajících infekcí.

V prvním dílu tohoto seriálu (Živa 2012, 3: 104–106) jsme již uvedli, že tvorba mikrobiálního biofilmu probíhá v několika základních fázích – atrakce buněk, jejich adheze, akumulace a disperze. Vzniku biofilmu však obvykle předchází vytvoření pelikuly – vrstvy iontů a organických molekul, které se na základě fyzikálních interakcí naváží na čistý povrch a usnadňují vazbu bakterií. Pelikula vzniká v prostředí bohatém na organické látky (krevní řečiště, dutina ústní apod.) během několika málo minut. V krevním řečišti se na její tvorbě podílejí různé bílkoviny (např. albuminy), ionty sodíku a draslíku, glykoproteiny (např. fibronektin) a další makromolekuly.

Přítomnost takového povrchu zjistí volně plovoucí bakterie během několika minut (atrakce) a náhodně, nebo s pomocí receptorů se začnou usazovat (fáze adheze a později akumulace). Počáteční vazba je ovlivněna elektrickými náboji vznikajícími mezi povrchem a buňkami (tvorba vodíkových můstků), Van der Waalsovými silami a elektrostatickou přitažlivostí. Později se bakterie pevně přichytí (adherují) za vzniku specifických vazeb. Vazby mají povahu chemickou, nebo jde o vazby mezi receptorem na povrchu bakterie a adhezinem (molekulou zprostředkující přichycení) na kolonizovaném povrchu. K pevně uchyceným bakteriím se přidávají další, vznikají mikrokolonie a dochází

k jejich rozrůstání dělením i koagregací, tedy vazbou dalších bakterií k bakteriím v biofilmu. Usazené buňky produkují polymerní látky, zejména polysacharidy, které tvoří další ze základních stavebních složek biofilmové vrstvy. Extracelulární hmota a voda představují celkem asi 98 % objemu bakteriální biofilmové struktury. Do této vrstvy se také mohou vázat buňky, bílkoviny a další látky z těla hostitele.

Během hodin až dnů vzniká zralý biofilm s houbovitými strukturami bakterií a exopolysacharidů, s dutinami a kanálky umožňujícími přísun živin i do jeho hlubších vrstev. Na přirozených površích lidského těla (dutině ústní, stěvně sliznice, vagina) se tvoří rozsáhlá konsorcia různých druhů bakterií, k nimž se mohou přidat i jiné mikroorganismy (améby, kvasinky apod.). Při kolonizaci umělých povrchů v primárně sterilních částech lidského těla (jako je např. krevní řečiště) jde většinou o biofilm jednodruhový, zatímco umělé povrchy v místech s přirozenou mikroflórou osídluje vícedruhová společenstva.

Po dosažení určité buněčné hustoty se ze zralého biofilmu začínají oddělovat buď jednotlivé buňky, nebo celé jejich shluky i s částmi biofilmu (fáze disperze). Buňky se uvolňují zpět do prostředí, např. do krevního řečiště, a mohou kolonizovat další vhodné povrchy. Tím v biofilmu vzniká dynamická rovnováha, která je regulována dostupností živin, podmínkami vnějšího prostředí, ale i buňkami samotnými, např. systémem quorum-sensing (hlavní regulační a komunikační prostředek bakteriálního společenstva, blíže Živa 2012, 3: 104–106), nebo produkci látek, které degradují polymerní struktury biofilmu a napomáhají tak uvolnění buněk. Existuje řada různých forem a struktur biofilmu, které vznikají v závislosti na vlastnostech okolního prostředí (např. pH, hydrodynamické síly), přítomnosti a dostupnosti živin a kyslíku a podle zastoupení konkrétních druhů bakterií.

Rezistence k antimikrobiálním látkám

Je známo, že mikrobiální buňky v biofilmu jsou mnohonásobně odolnější k antimikrobiálním látkám (biocidům) než planktonické buňky stejného kmene. Zvýšená

rezistence biofilmů k biocidům je prokázána *in vitro* (účinnost biocidů byla o jeden až čtyři řády nižší oproti buňkám planktonickým) a je významnou komplikací u infekcí implantátů a cizích těles *in vivo*.

Biofilmová rezistence se projevuje několika základními mechanismy, které se liší v závislosti na druhu mikroba schopného tvořit biofilm, a aplikované antimikrobiální látky. Rozdíl je též v tom, jaké reakce se projevují v počáteční fázi růstu a jaké u plně vyzrálého a starého biofilmu. Mezi nejvýznamnější a nejvíce prostudované mechanismy biofilmové rezistence patří: fyzikální a chemické bariéry bránící průniku látek do biofilmové vrstvy, snížená rychlost růstu buněk v biofilmu, aktivace univerzální stresové odpovědi, vznik určité rezistentní skupiny buněk (perzistorů), vznik fenotypu specifického pro biofilm a exprese pravděpodobných genů rezistence. Všechny tyto faktory se v biofilmu spíše vzájemně doplňují, než působí jednotlivě. Roli hrají i „klasické“ mechanismy bakteriální rezistence (jako např. snížená propustnost buněčné stěny, enzymatická inaktivace antimikrobiální látky, její aktivní vylučování z buňky nebo modifikace či nahrazení cíle jejího účinku), které se projevují i v planktonických bakteriálních kulturách. Ve vícetrvahovém biofilmu je problematika rezistence ještě složitější.

● Snížený průnik látek do biofilmu

Biofilmová vrstva může tvořit bariéru dvěma způsoby – jako síto nepropouštějící větší molekuly, nebo jako donor volných vazebných míst. Mechanismus síta poskytuje účinnou ochranu proti velkým molekulám imunitního systému hostitele, jako jsou např. antimikrobiální proteiny – lysozymy a komplement. Poměrně silně hydratované polyanionické polysacharidy a glykoproteiny biofilmové vrstvy působí jako výměníky iontů a adsorbují kationty antimikrobiálních látek. Ve většině případů však polysacharidové bariéry postup těchto látek pouze zpomalí – příkladem jsou fluorované chinolony. I tato časová prodleva však může zvýšit efektivitu obrany bakteriální buňky, např. enzymatické degradace pronikající antimikrobiální látky.

● Pomalý růst biofilmu

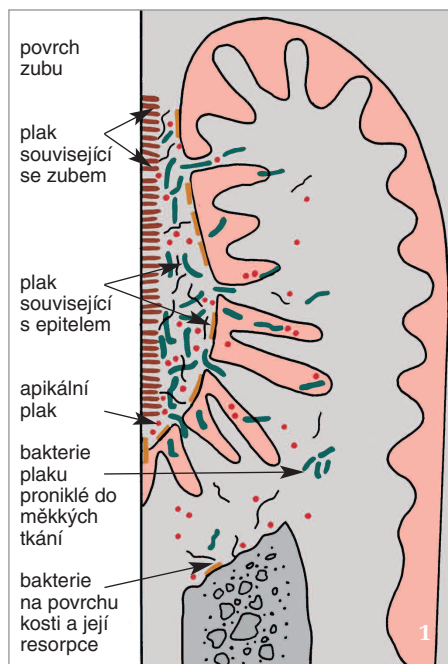
a heterogenita mikrobiální populace

Při nasycení určitého prostředí bakteriemi nebo při úbytku živin dochází v bakteriální populaci ke zpomalení růstu, které obecně provází zvýšená rezistence k antibiotikům cíleným na rostoucí bakterie. Některé studie prokázaly, že růstová rychlost mikrobů (např. *Staphylococcus epidermidis*) v biofilmu silně ovlivňuje jeho citlivost – čím rychlejší růst, tím dříve tato antibiotika buňky inaktivují.

Ve vyzrálých biofilmech lze pozorovat trojrozměrnou strukturu s mnoha typy mikroprostředí, jež se liší např. osmolariitou, přísunem živin či buněčnou hustotou. Gradienty živin, různé odpadní produkty a četné signalizační faktory, to vše přispívá k heterogenitě. Proto se nabízí předpoklad, že i mikrobiální společenstvo biofilmu je heterogenní a jednotlivé buňky nebo jejich populace žijí v rozdílných podmínkách, a tedy i rostou různou rychlostí.

● Vznik perzistorů

Již v r. 1944 publikoval Joseph W. Bigger v časopise *The Lancet* článek o svých vý-



1 Rozložení subgingiválního zubního plaku (části zubu zanořené do dásně).

Podle: M. Gajardo (2009) kreslila

M. Chumchalová, upraveno

2 Vrstva smíšeného biofilmu s bakteriemi *Staphylococcus epidermidis* a kvasinkami *Candida parapsilosis* u pacienta s katérovou sepsí. Buňky jsou přichyceny na povrchu katétru a tvoří mikrokolonie obalené extracelulární hmotou. Díky mikroskopickému průkazu biofilmu se podařilo odhalit oba původce ještě v den odběru a zahájit cílenou léčbu o dva dny dříve než při konvenčních technikách kultivace. Barveno toluidinovou modří. Foto: V. Holá a F. Růžička

zkumech s účinkem penicilinu na bakterie. Jedním z poznatků bylo, že při vystavení stafylokokové kultury účinkům penicilinu přežila malá část buněk, které Bigger nazval perzistori. Počet perzistorů v bakteriální populaci odhadl na 10^{-6} a ukázal též, že jejich kultivace a množení vzniká populace nerozpoznatelná od té původní – podobně citlivá k inhibici růstu penicilinem a se stejným procentem nových perzistorů. Tyto pokusy se podařilo zopakovat se shodnými závěry i u jiných bakterií – přežívající perzistori jsou tedy pouze fenotypovou variantou původního kmene. V řadě studií byla přítomnost těchto buněk identifikována i v biofilmech.

● Univerzální odpověď na stres

Bakterie odpovídají na nedostatek živin a na jiné environmentální strese syntézou sigma-faktorů. Ty regulují transkripci genů, jejichž produkty zmírňují účinky stresu – aktivuje se mechanismus univerzální odpovědi založený např. na změně propustnosti buněčné membrány pro antimikrobiální látky.

● Vznik biofilmového fenotypu

Již před 10 lety se objevila v lékařské mikrobiologii teorie, že primární adheze bakterií k povrchu může vést k indukci nebo represí genů, které mohou dále ovlivnit mnohé fyziologické odpovědi. DNA microarray analýzy ukázaly, že se exprese genů mezi biofilmovými a planktonickými buňkami skutečně liší, např. u *Bacillus subtilis*

o 6 %, u *Pseudomonas aeruginosa* o 1 %. V případě *S. epidermidis* se odlišnost projevuje mimo jiné expresí specifických operonů (tedy skupin genů vytvářejících funkční jednotky se společnou regulací). Taková indukce genotypu specifického pro biofilm pak může vést k aktivaci mechanismů potlačujících účinky antimikrobiálních látek.

● Další mechanismy

Role systému quorum-sensing v biofilmové rezistenci k antimikrobiálním látkám není dosud zcela jasná. Svou roli hraje stáří a zralost biofilmové vrstvy, čemuž odpovídají i klinické zkušenosti s léčbou biofilmových infekcí. V případě časných infekcí bývá např. v ortopedii odstranění ložiska s ponecháním protézy úspěšnější než u pozdních pooperačních infekcí, které měly čas se určitou dobu vyvíjet.

V biofilmu se také díky úzkému kontaktu buněk mohou snáze šířit plazmidy a extrachromozomální úseky DNA. Právě plazmidy a transpozony kódují rezistenci k řadě antimikrobiálních látek. Četnosti tohoto horizontálního přenosu (Živa 2006: 1–6) genetické informace jsou v biofilmu o několik řádů vyšší než v planktonické kultuře stejné bakterie.

Biofilm v lidském těle

● Přirozená mikroflóra

Na různých místech našeho těla se mikroorganismy udržují často právě ve formě biofilmu. Jde o biofilmy na povrchu sliznic, zubní skloviny a pokožky, které jsou vystaveny vlivu mikrobů z vnějšího prostředí. Naše přirozená mikroflóra je za normální situace nejen nepatogenní, ale naopak působí pozitivně jako další stupeň obrany před patogeny (colonisation resistance, tedy obrana tím, že je povrch již osídlen zástupci přirozené mikroflóry). Přirozená mikroflóra brání kolonizaci nejen pasivně, ale i aktivně – produkcí látek, které využívá na svou ochranu, a tím pomáhá celému organismu. Příkladem může být tvorba bakteriocinů (látek bílkovinného charakteru s antibiotickým účinkem) nebo třeba kyseliny mléčné produkované laktobacily na vaginální sliznici. Pozitivním efektem přirozené mikroflóry v trávicím traktu je rozklad látek, které naše vlastní enzymy nejsou schopny štěpit, stejně jako produkce látek, které si lidské tělo samo vyrobit nedokáže (např. vitamín K). Pokud se však naruší rovnováha mezi makroorganizmem a přirozenou mikroflórou (např. oslabením odolnosti hostitele, přílišným namnožením těchto mikrobů), mohou být i zástupci přirozené mikroflóry příčinou vzniku zánětu v daném místě, nebo dalšího šíření mikrobů v těle hostitele.

Vlastnosti a složení přirozené mikroflóry se u jedince mění s věkem. Ekologické podmínky se též mění při každém, i drobném lékařském zákroku v dané části těla, např. při vytržení zubu nebo jakékoli operaci. Dočasné změny ve složení a stabilitě mikrobiálních společenstev (zejména trávicího traktu) mohou být ovlivněny i frekvencí a typem stravy či léčbou antibiotiky.

● Dutina ústní

Zdáleka ne všechny mikroorganismy, které se dostanou do dutiny ústní, jsou schopny ji kolonizovat. Nacházejí se zde různé biotopy, které jsou osídleny rozdílnými mi-

krobiálními společenstvy lišícími se nejen zastoupením mikrobů, ale i složením extracelulární složky biofilmu. Zcela odlišnými podmínkami pro kolonizaci se vyznačují povrchy sliznic, např. rtů, vnitřní strany tváří (bukální sliznice), měkkého patra nebo jazyka, a povrch zubů. Na zubech najdeme různé typy biofilmu mezi částí zanořenou do dásně (subgingivální, obr. 1) a korunkou (supragingivální). Udává se, že se v dutině ústní vyskytuje ca 700 bakteriálních druhů. Na jejich sliznicích se vytváří biofilmové společenstvo složené zejména z různých druhů viridujících streptokoků a zástupců rodu *Neisseria*, ale i dalších bakteriálních rodů, např. *Haemophilus* a *Lactobacillus*. Na jazyku se přidávají anaerobní bakterie, např. rody *Veillonella*, *Fusobacterium* a *Bacteroides*.

Jedním z nejznámějších biofilmů je zubní plak. Při jeho tvorbě dominují zpočátku streptokoky, které v průběhu několika dnů následují tzv. sekundární a terciární kolonizátoři. Mezi typické sekundární kolonizátory patří aktinomycety a *Fusobacterium nucleatum*, které slouží jako „most“ mezi *Streptococcus gordonii* a pozdními kolonizátory, např. *S. salivarius*, zástupci rodu *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Porphyromonas*, *Veillonella* aj. Kongregace jednotlivých bakteriálních druhů je zprostředkována specifickými adheziny na jejich povrchu. Plně vyzrálého biofilmu mohou mikroby dosáhnout zejména na špatně přístupných místech, např. v mezizubních prostorech. Do tohoto stavu se zubní plak dostává v průběhu 2–3 týdnů, kdy se ustálí charakteristický biofilm složený z poměrně stálého společenstva bakterií. Zubní plak přirozené mikroflóry je důležitou součástí ochranných mechanismů hostitele – pomáhá bránit kolonizaci zubní skloviny exogenními mikroorganismy. Na druhou stranu je však hlavní příčinou onemocnění dásní a závěsného aparátu zubů (parodontopatie) a rozhodujícím faktorem při tvorbě zubního kazu. Jeho mineralizací vzniká zubní kámen.

Ve formě biofilmu k zubní sklovině adherují i bakterie považované za nejvýznamnější původce zubního kazu – streptokoky ze skupiny *S. mutans*. Tyto bakterie syntetizují ze sacharózy polysacharidy glukany a fruktany lepkavé konzistence,

které slouží nejen jako pomůcka pro silnější přilnutí k zubní sklovině, ale i jako zásobárna živin pro období bez dostatečného přísunu cukrů ve stravě. Tyto streptokoky jsou zároveň schopny rychle tvořit z cukrů kyseliny a množit se i za nízkého pH, přičemž hodnoty pH nutných k demineralizaci skloviny dosahují rychleji než ostatní bakterie. Zůstává za nimi i rod *Lactobacillus* považovaný z hlediska vzniku zubního kazu za druhou silně rizikovou skupinu. Vezmeme-li však v úvahu výrazné rozdíly v mikrobiálním složení zubního plaku odebíraného ze stejného místa v dutině ústní v různé době, je velmi nepravděpodobné, že za vznik a rozvoj zubního kazu mohou pouze tyto dvě malé skupiny bakterií. Je známo, že prakticky všechny mikroby zubního plaku mají kvůli svým biochemickým vlastnostem kariogenní účinek (mohou vyvolávat vznik kazu).

Zubní plak i další biofilmy ústní dutiny jsou zdrojem bakterií, které mohou být příčinou biofilmových infekcí krevního řečiště, vzniku endokarditidy (zánětu srdeční nitroblány), infekce cévních implantátů a katétrů. Do krevního oběhu se dostávají při invazivních výkonech, ale i při drobných poraněních, např. při čištění zubů.

● Trávicí soustava

V trávicím traktu se přítomná přirozená mikroflóra přímo účastní na jeho funkci. Bakterie okyselují střevní obsah, produkují vitamíny (např. B₁₂ a K) a blokují přeměnu dusičnanů na dusitany. Samotná kolonizace střevní sliznice nepřetržitě stimuluje imunitní systém střeva.

Sliznici střeva pokrývá stále se obměňující hlenová vrstva, která je spolu s přisedajícími patogeny odstraňována peristaltikou. Kolonizace střeva bakteriemi je tedy velmi dynamický proces – přítomnost jednotlivých druhů a kmenů bakterií se může často měnit (kolonizace versus vytlačování). Ve střevní mikroflóře bylo detekováno kolem tisíce bakteriálních druhů a zhruba 10 tisíc kmenů. Zástupci přirozené mikroflóry využívají k přežití v tomto ekosystému zejména adhezínů a bičíků, díky nimž jsou schopni udržet se i ve vazkém hlenu. Navíc biofilm se podle některých publikovaných prací nenachází pouze na střevní sliznici, ale i na částech potravy, které střevem procházejí.

Řada zástupců přirozené mikroflóry trávicího traktu patří mezi striktní anaeroby (v tlustém střevě až 99 %), kam řadíme např. zástupce rodů *Bacteroides* (ca 30 % všech bakterií ve střevě), *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus* a *Eubacterium*. Další bakterie se ve střevě vyskytují v menší míře, jako např. enterobakterie (*Escherichia coli*, rody *Klebsiella* a *Enterobacter* aj.), zástupci bifidobakterií (např. *Bifidobacterium bifidum*), laktobacilů (*Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei* aj.) nebo *Enterococcus faecalis*.

● Kůže

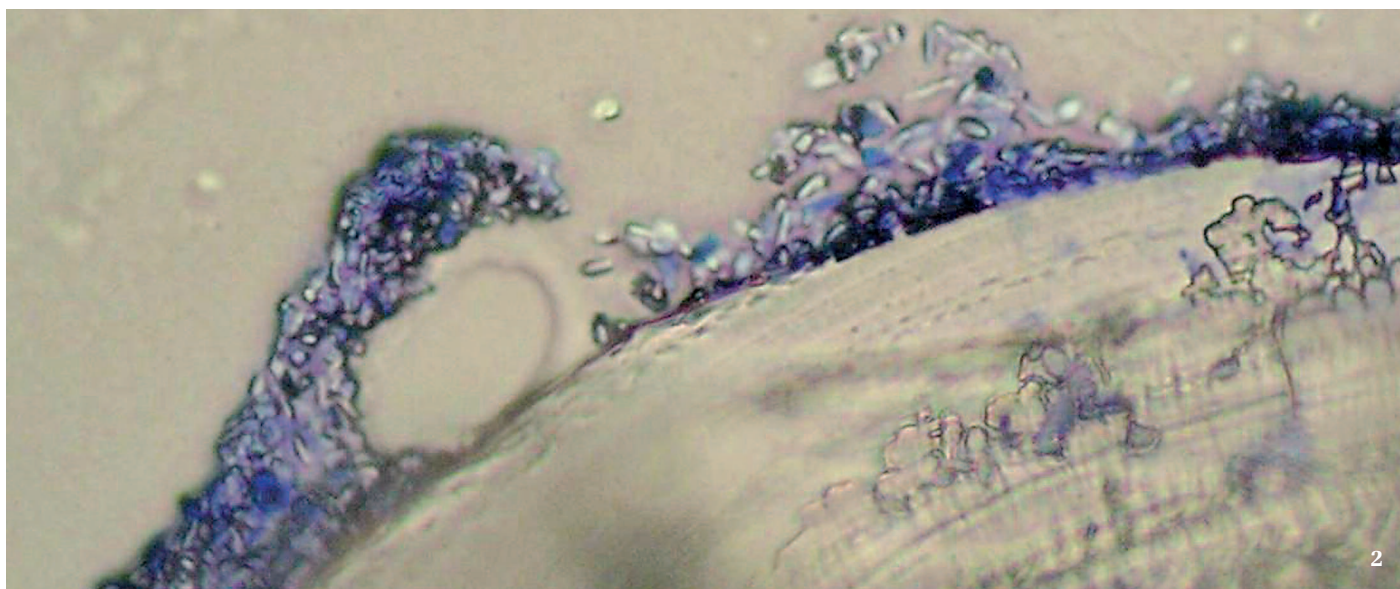
Na kůži vytváří biofilm zejména *Staphylococcus epidermidis*. Usazuje se mezi buňkami dlaždicového epitelu do hloubky 5–10 vrstev a kolonizuje mazové žlázy a vlasové a chlupové míšky. Jeho přítomnost snižuje riziko kolonizace kůže např. *S. aureus*, který by zde našel rovněž vhodné podmínky, ale ve srovnání se *S. epidermidis* představuje pro člověka větší riziko. Kromě *S. epidermidis* se na kůži vyskytují i další druhy stafylokoků, korynebakteria a některé streptokoky.

● Dýchací trakt

I při nerovnováze v mikrobiálním společenstvu horních cest dýchacích se projevují infekce způsobené mikroorganismy, které jsou jinak součástí přirozené mikroflóry. Jde např. o *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus parainfluenzae* a *Neisseria meningitidis*. Z nepatogenních bakterií v horních cestách dýchacích najdeme zejména viridující streptokoky. U určitého procenta jedinců přetrvávají v biofilmu horních cest dýchacích i patogeny, např. *S. aureus* či *H. influenzae*. Po většinu času nevyvolávají klinické známky onemocnění, které způsobují, k propuknutí nemoci dochází opět až při narušení rovnováhy v organismu (předchozí virovou infekcí horních cest dýchacích apod.). I kolonizace patogeny, jako je *S. aureus*, může být pro jedince výhodná – byla prokázána souvislost s přítomností *S. aureus* v horních cestách dýchacích a nižším výskytem hnisavých streptokokových angín.

● Urogenitální trakt

Přirozenou a nejpočetnější složkou vaginálních biofilmů jsou laktobacily, z nich pak zástupci komplexu *L. acidophilus*



(zejména *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*). Laktobacily produkují kyselinu mléčnou snižující okolní pH (na hodnoty pH 3,8–4,2), peroxid vodíku a bakteriociny. Kyselinu uvolňují fermentací glykogenu, jímž jsou vyplněny povrchové buňky vrstevnatého poševního epitelu – glykogen se tam hromadí pod vlivem ženských pohlavních hormonů estrogenů a vaginální buňky tak vlastně podporují bakterie pro svou ochranu. Uvedené tři faktory společně výrazně omezují růst patogenní mikroflóry. Ve vaginálním biofilmu se dále nacházejí např. i bifidobakterie, enterokoky, peptokoky, peptostreptokoky a další aerobní i anaerobní bakterie.

Biofilmové infekce a související onemocnění

Bakterie ve formě biofilmu způsobují řadu chronických a obtížně léčitelných onemocnění. Růst ve formě biofilmu pro ně představuje významný faktor virulence – již bylo řečeno, že usnadňuje kolonizaci umělých i přirozených povrchů, ale také chrání před imunitním systémem a účinkem antibiotik. U biofilmových infekcí se často nedají splnit Kochovy postuláty (soubor čtyř pravidel prokazujících příčinnou souvislost mezi patogenem a onemocněním) a dá se proto obtížněji prokázat, že biofilm je původcem dané choroby. V některých případech lze nanejvýš říci, že mezi přítomností mikroorganismů v biofilmu a onemocněním je určitý vztah – někdy těsnější (např. u cystické fibrózy nebo u postižení chlopni při endokarditidě), jindy slabší (např. u chronické prostatitidy či zánětu středouší).

Umělé povrchy

Časté používání implantátů a plastových pomůcek v medicíně je jednou z hlavních příčin rostoucího významu biofilmů. Tyto povrchy představují svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi vhodný podklad pro vznik biofilmu.

● Krevní řečiště

Mezi nejzávažnější biofilmová onemocnění patří infekce umělých implantátů zavedených do krevního řečiště, tj. především katétrů, cévních protéz, umělých chlopni nebo kardiostimulačních elektrod. Jen v USA je každoročně zavedeno více než 15 milionů katétrů, v Německu 1,75 milionu katétrů za rok (infekce vzniká u 1–5 %), implantováno více než 70 tisíc kardiostimulátorů (infikováno 1–3 %) a více než 18 tisíc umělých chlopni (infikováno 0,4–6 %).

Ke komplikacím spojeným s vysokou úmrtností (kolem 25 %) patří infekce umělých chlopni. Riziko jejich vzniku se tedy pohybuje v rozmezí 0,4–6 % a nejčastějšími původci jsou stafylokoky. Z dalších bakterií se podílejí, podobně jako u infekcí nativních chlopni, viridující streptokoky, enterokoky a *S. aureus*, méně často gramnegativní bakterie a kvasinky (rod *Candida*).

U katétru bakterie kolonizují jak vnější, tak vnitřní povrch. Nejčastěji bývají izolovány *S. epidermidis* a jiné koaguláza-negativní stafylokoky (50–70 %), dále pak *S. aureus*, enterokoky, gramnegativní nefermentující tyčinky (pseudomonády aj.), enterobakterie (*E. coli*, *Klebsiella pneumo-*

niae aj.), kvasinky rodu *Candida* a další. Biofilm na katétrech se stává zdrojem další infekce a může vést až k sepsi a selhání životně důležitých orgánů. Zároveň se z ložiska uvolňují jednotlivé buňky, shluky buněk i infikované tromby (krevní sraženiny) a po odnesení krevním tokem mohou založit nová ložiska zánětu. Relativně vysoká úmrtnost v těchto případech (5–25 %) je spojena právě se vznikem sepsí a dalších komplikací a s jejich obtížnou léčbou.

● Močové cesty

Infekce močových cest spojené s dlouhodobou katetrizací jsou velmi častým problémem způsobeným biofilmy. Jejich výskyt souvisí s délkou doby zavedení katétru. U katétrů zavedených méně než 7 dnů bývá infikováno 10–50 % pacientů, při katetrizaci delší než 28 dní se infekce rozvíjí prakticky vždy. Katétrů jsou pro bakterie přímým vstupem až do močového měchýře a výrazně jim usnadňují kolonizaci močových cest. Dochází pak k dalším komplikacím, např. k ucpávání katétrů krystalickými nánosy bakteriálního původu, tvorbě močových kamenů a pyelonefritidám (zánětům ledvin). Podle některých studií může toto zvýšené dráždění močových cest vést až k nádorovému bujení.

Mezi nejčastější kolonizátory močových katétrů patří *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, druhy rodu *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes* a další. Velmi často se vyskytují smíšené bakteriální populace. Bakterie se na povrch katétrů mohou dostat již při jejich zavádění, migraci z okolních tkání po jeho povrchu, nebo mohou postupovat vnitřkem katétru, např. z vaků na shromažďování moči. Přítomnost některých bakterií (*P. aeruginosa*, druhy rodu *Proteus* a další) vede ke zvyšování pH moči. Při vysokých koncentracích vápníku a dalších minerálů pak dochází k mineralizaci biofilmu a vzniku bakteriálních močových kamenů (ty tvoří zhruba 15–20 % všech močových kamenů).

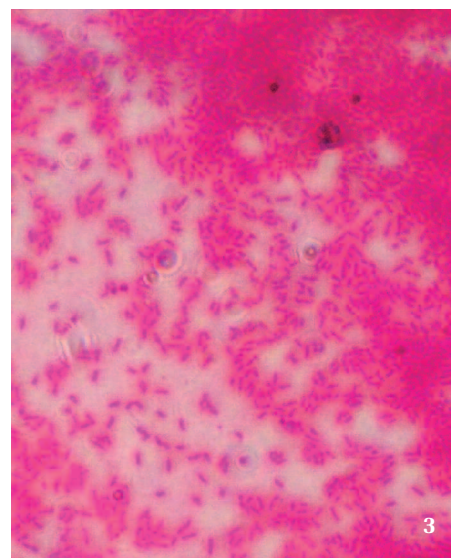
● Kloubní náhrady

Nejčastějšími patogeny infekcí kloubních náhrad jsou stafylokoky. Velmi dobré podmínky se nacházejí v oblasti mezi vlastní kloubní náhradou a kostí, která je samotným zákrokem traumatizována. Přichycení a pomnožení bakterií napomáhá pokrytí umělých ploch fibrinem a dalšími bílkoviny a přítomnost hematomů z traumatizované tkáně. Infekce kloubních náhrad vedou k jejich uvolnění a nefunkčnosti, bakterie mohou navíc přestoupit do okolní kosti a tkání.

● Další umělé povrchy

K dalším povrchům s rizikem vzniku infekce patří např. kontaktní čočky, kde se uplatňují zejména koaguláza-negativní stafylokoky, *Pseudomonas aeruginosa* a zástupci rodů *Proteus* a *Candida*. Tyto biofilmy mohou obsahovat i améby (např. z rodu *Acanthamoeba*). Dochází k chronickému dráždění rohovky, případně k rozvoji zánětu.

Rovněž kolonizace povrchu nitroděložních tělísek může vést až k zánětům dělohy a následnému zánětu v oblasti pánve. Nitroděložní tělíška bývají pravidelně osídlena aktinomycetami a bakteriemi poševní mikroflóry, u žen trpících záněty



byly v tomto biofilmu prokázány také beta-hemolytické streptokoky, *S. aureus*, *E. coli* nebo anaerobní bakterie.

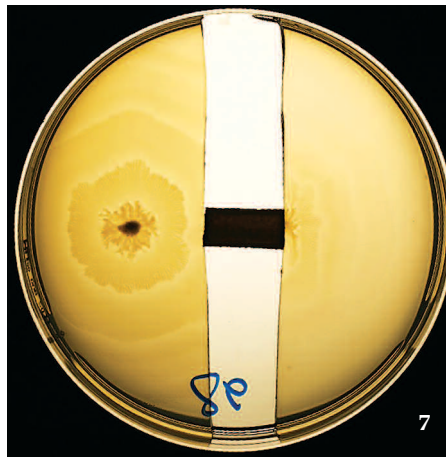
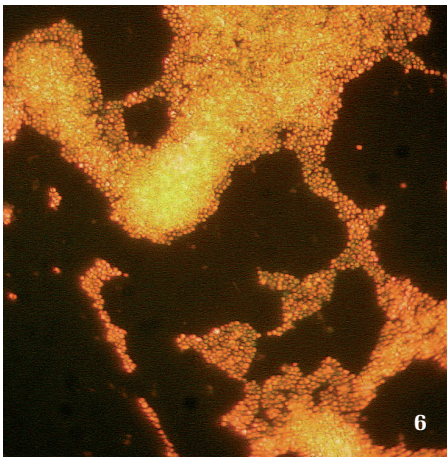
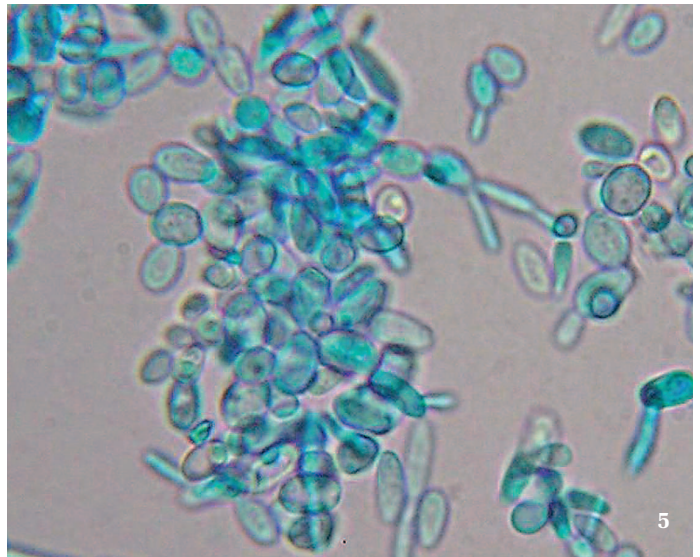
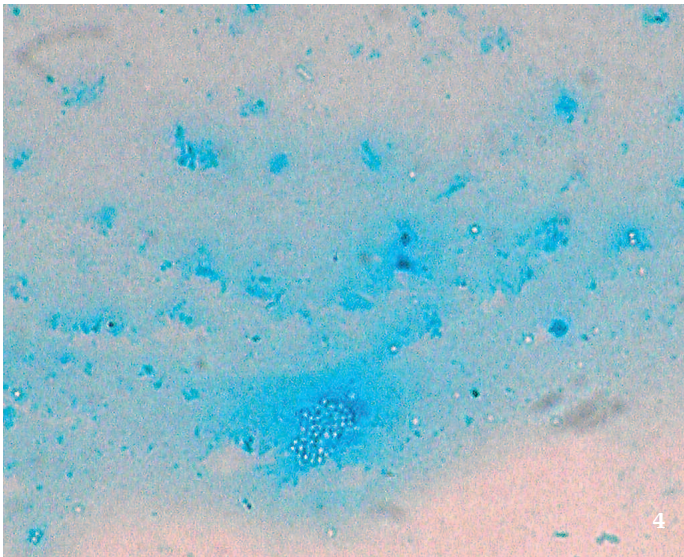
Bakteriální biofilm se vytváří i na mnoha dalších umělých pomůčkách a implan-tátech, jako např. na kanylách zaváděných do průdušnice (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* aj.), postiženy mohou být i hlasivkové protězy (streptokoky, stafylokoky, kandidy), dialyzační katétrů, drény ran, zubní protězy apod.

Biofilmy měkkých tkání

Dobře prostudovaná je role bakterií *Burkholderia cepacia* a *Pseudomonas aeruginosa* vyvolávajících těžké záněty plic u nemocných cystickou fibrózou. Snižovaná samočisticí schopnost sliznic v dolních cestách dýchacích u těchto pacientů vede k jejich vyšší náchylnosti k infekcím. Dochází ke kolonizaci dýchacích cest, *B. cepacia* a *P. aeruginosa* produkují velké množství biofilmové polymerní matrix, jež chrání bakterie před fagocytózou i účinky antibiotik. Bakterie dlouhodobě přežívají v plicní tkáni, a tak se rozvíjí těžký chronický zánět plic, který špatně reaguje na léčbu a vede až ke smrti nemocného.

Mezi závažné biofilmové infekce přirozených povrchů patří infekční endokarditida. Její výskyt se pohybuje kolem 3,6 případů na 100 tisíc obyvatel za rok a bývá obvykle způsobena streptokoky (viridující streptokoky, pneumokoky a *S. bovis*), stafylokoky a enterokoky, méně často pak některými gramnegativními bakteriemi a kandidami. Původci těchto endokarditid bývají součástí běžné mikroflóry sliznic nebo kůže a do krevního oběhu se dostávají porušením kožní nebo slizniční bariéry. Významným předpokladem pro vznik a rozvoj bakteriální endokarditidy je také srdeční vada – poškozený endokard, na který se bakterie přichytí. Biofilm omezuje správné fungování srdeční chlopni a dále ji poškozuje. Zároveň přítomnost jeho ložiska v krevním řečišti je příčinou chronické sepsě (neléčená může během několika měsíců vyústit v úmrtí pacienta). Uvolněné infikované tromby mohou vyvolat embolii nebo rozsev infekčního procesu do jiných částí krevního řečiště.

Růst bakterií ve formě biofilmu se podílí také např. na zánětu středouší nebo prostaty. U těchto infekcí, zejména v jejich



3 Barvení karbolfuchsinem lze v rutinní mikrobiologické diagnostice použít k detekci biofilmopozitivních mikrobů z tekutých kultur. Kmen (nebo klinický vzorek) se kultivuje 24 hodin ve zkumavce v nutričně bohatém bujónu, poté se stěr z vnitřní stěny nanese na podložní sklíčko a fixuje. Nátěr se barví za tepla koncentrovaným karbolfuchsinem a oplachuje roztokem modré skalice. Buňky získají sytě fialovou barvu, biofilmová vrstva (v okolí sytě fialových buněk) barvu růžovou. Na snímku kmen *Pseudomonas aeruginosa* tvořící biofilm

4 Mikroskopický snímek biofilmu *Staphylococcus epidermidis*, barveno alcianovou modří, která se selektivně váže na polysacharidy. Stafylokoky rostoucí ve formě biofilmu produkují velké množství extracelulárních polysacharidů – na obr. dobře patrná polysacharidová biofilmová vrstva obklopující shluky stafylokokových buněk.

5 Mikroskopický snímek kvasinkového biofilmu (typická je tvorba pseudohyfy) barveného alcianovou modří. Kvasinkové buňky rostoucí ve formě biofilmu produkují pouze malé množství extracelulární hmoty, která je těsně obklopuje. Snímky V. Holé, není-li uvedeno jinak

6 Plně vyvrážený biofilm je komplexní trojrozměrná struktura s mnoha odlišnými typy mikroprostředí, což přispívá k heterogenitě v mikrobiální populaci

biofilmu. Různorodost je možné zviditelnit barvením akridinovou oranží. Výsledná barva je totiž ovlivněna poměrem RNA/DNA. Buňky s vysokým relativním obsahem RNA (rychle rostoucí buňky) se barví do oranžova až oranžovočervena, buňky s nízkým relativním obsahem RNA (pomalu rostoucí) do zelena až žlutozelena. Na snímku obarvený biofilm bakterie *Staphylococcus epidermidis*. Foto: V. Holá a F. Růžička

7 Zástupci rodu *Proteus* jsou schopni pohybu po povrchu močového katétru. Na snímku laboratorní test k prokázání této schopnosti u konkrétního typu katétru. Kmen bakterie se naočkuje na jednu polovinu agarů a po 24hodinové kultivaci se hodnotí schopnost bakterie dostat se na druhou polovinu Petriho misky přes můstek tvořený testovaným katétre. Foto: V. Holá a T. Peroutková

chronické fázi, často není možno mikroba prokázat klasickými kultivačními postupy a záněty neodpovídají na léčbu. Přesto v biopsiích lze pozorovat zřetelné biofilmy obsahující mikrokolonie bakterií uvnitř polymerní matrix a přítomnost mikrobů lze prokázat i pomocí molekulárně-biologických technik. U bakteriálních zánětů středouší nacházíme jako nejčastějšího původce *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, *Streptococcus pyogenes* nebo *Staphylococcus aureus*, řidčeji pak i další bakterie. Zánět prostaty, který je

v časných fázích dobře léčitelný antibiotiky, může přecházet do chronické prostatitidy, kdy je léčba již mnohem obtížnější. Jako nejčastější původce se zde uplatňuje *E. coli*, ale příčinou mohou být i další enterobakterie (rody *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*), *P. aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* a další koagulázanegativní stafylokoky nebo *E. faecalis*. Méně často jsou prokázanými původci prostatitid i zástupci rodů *Corynebacterium*, *Mycoplasma*, *Bacteroides*, *Chlamydia* či *Gardnerella*.

Kromě výše uvedených zánětů středouší a prostaty biofilmy ztěžují léčbu též např. u zánětů hltanu a patrových mandlí (faryngitidy a tonzylfaryngitidy). Nejčastějším původcem bakteriálních faryngitid a tonzylfaryngitid je u dětí i u dospělých *S. pyogenes* a lékem volby je tedy penicilin. Přestože dosud nebyl zaznamenán jediný případ kmene *S. pyogenes* rezistentního k penicilinu, selhává tato léčba až ve třetině případů. Jedním z možných vysvětlení, které je podloženo rovněž opakovanými experimenty, je právě schopnost růstu kmenů *S. pyogenes* ve formě biofilmu, kde bakterie odolávají mnohem vyšším koncentracím antibiotik.

Problematika ran

Zvláštním případem jsou infekce ran. Zejména v chronických a špatně se hojících ranách lze prokázat komplexní mikrobiální společenstva. Biofilm nacházíme již 10 hodin po infekci etiologickým agens. Nejdříve se objevují zástupci aerobních nebo fakultativně anaerobních bakterií, např. *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *E. coli* nebo druhy rodů *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Klebsiella* apod., o něco později anaerobní bakterie, např. rody *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus* nebo *Prevotella*.

Dovětek

Všechny biofilmové infekce znamenají pro pacienty i celý systém zdravotnické péče delší a složitější léčbu, delší rekonvalescenci a vyšší náklady. Proto by prevence vzniku biofilmových infekcí měla být nezbytnou součástí péče o pacienta.