Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Tvorba biofilmů u plísní a kvasinek

Tereza Myšková

Bakalářská práce

2015

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: **2012/2013**

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Tereza Myšková**
Osobní číslo:	**C10425**
Studijní program:	**B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor:	**Zdravotní laborant**
Název tématu:	**Tvorba biofilmů u plísní a kvasinek**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování:

Charakterizujte biofilm - tvorba, význam, faktory ovlivňující vznik biofilmu.
Uveďte metody detekce biofilmu.
Vyhledejte a charakterizujte nejdůležitější kvasinky a plísně tvořící biofilmy, zaměřte se zejména na biofilmy zdravotnických materiálů a na zdravotní obtíže způsobené biofilmy.
Biofilmy kvasinek a plísní ve vodních systémech, potravinářském průmyslu a v prostředí - popište faktory vzniku a obtíže způsobené tvorbou biofilmů.
Uveďte možnosti zabránění tvorby biofilmů a způsoby jejich odstraňování.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Petra Moťková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **13. prosince 2012**
Termín odevzdání bakalářské práce: **19. července 2013**

prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2013

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 18. 3. 2015

Tereza Myšková

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí své bakalářské práce paní Ing. Petře Moťkové, Ph.D. za její cenné rady a připomínky při vypracování této práce. Zároveň paní inženýrce patří velké poděkování za její obětavý přístup.

ANOTACE

Práce je věnovaná schopnosti plísní a kvasinek tvořit biofilm. Popsán je jak pozitivní, tak negativní významu biofilmu – zvláště ve zdravotnictví, kdy vznik biofilmu vede ke komplikacím a následným onemocněním. Dále jsou uvedeny možnosti odstranění biofilmu.

KLÍČOVÁ SLOVA

biofilm, plísně, kvasinky, zdravotnictví

TITLE

Biofilm formation in yeasts and molds

ANNOTATION

My bachelor thesis is about abilities of molds and yeasts to create biofilm and the effect of biofilm from positive and negative point of view. This also introduced the biofilm formation in healthcare in connection with diseases. In this thesis you can also find possible solutions for the removal of biofilm.

KEYWORDS

biofilm, mold, yeast, healthcare

SEZNAM ZKRATEK

A. fumigatus – *Aspergillus fumigatus*

A. niger – *Aspergillus niger*

C. albicans – *Candida albicans*

C. glabrata – *Candida glabrata*

C. neoformans – *Cryptococcus neoformans*

C. parapsilosis – *Candida parapsilosis*

C. tropicalis – *Candida tropicalis*

CDBT – agar s kreatininem, thyminem, dextrosou a bromthymolovou modří (creatinine dextrose bromothymol blue thymine)

ConA – konkavalium a Alexa Fluor 488 konjugát (concavalium and Alexa Fluor 488 conjugate)

CSLM – skenovací konfokální laserová mikroskopie (confocal scanning light microscopy)

CYA – Czapek agar s kvasnicovým extraktem (Czapek yeast extract agar)

CZ – Czapek Dox agar (Czapek Dox agar)

DGGE – denaturační gradientová gelová elektroforéza (denaturing gradient gel electrophoresis)

DNA – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

ECM – extracelulární matrix (extracellular matrix)

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina (ethylenediaminetetraacetic acid)

EPS – extracelulární polysacharidy (extracellular polysaccharides)

F. oxysporum – *Fusarium oxysporum*

FUN-1- cytoplazmatická fluorescenční sonda (cytoplasmic fluorescent probe)

HIV – virus lidské imunitní nedostatečnosti (human immunodeficiency virus)

HWP1– protein stěny hyf 1 (hyphal wall protein 1)

IUD – nitroděložní tělísko (intrauterine device)

PBS – fosfátový pufr (phosphate buffered saline buffer)

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PDA – bramborový dextrosový agar (potato dextrose agar)

PVC – polyvinylchlorid (polyvinyl chloride)

RNA – ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)

SDA – sabouraudův dextrosový agar (sabouraud dextrose agar)

SEM – skenovací elektronová mikroskopie (scanning electron microscopy)

SL – sladinový agar (wort agar)

T. asahii – Trichosporon asahii

UV oblast – ultrafialová oblast (ultraviolet)

WHO – světová zdravotnická organizace (world health organization)

YNB – kvasničné médium s dusíkatým základem (yeast nitrogen base medium)

Obsah

Úvod 11

1 Biofilm 12

1.1 Negativní vliv biofilmu 13

1.2 Pozitivní vliv biofilmu 13

2 Tvorba biofilmu plísní a kvasinek 14

2.1 Faktory ovlivňující vznik biofilmu 15

2.2 Regulace tvorby biofilmu 15

3 Metody detekce biofilmu 16

3.1 Mikroskopické metody 16

3.1.1 Skenovací elektronová mikroskopie 16

3.1.2 Fluorescenční mikroskopie a skenovací konfokální laserová mikroskopie 17

3.2 Genetické testy 18

3.2.1 Northern blot analýza 18

3.2.2 Denaturační gradientová gelová elektroforéza 19

3.2.3 Polymerázová řetězová reakce s polymorfismem délek restrikčních fragmentů 19

4 Nejdůležitější kvasinky a plísně tvořící biofilm 21

4.1 Kvasinky 21

4.1.1 *Candida albicans* 21

4.1.2 *Candida tropicalis* 21

4.1.3 *Candida glabrata* 22

4.1.4 *Cryptococcus neoformans* 22

4.1.5 *Trichosporon asahii* 23

4.2 Plísně 23

4.2.1 *Fusarium oxysporum* 23

4.2.2 *Aspergillus niger* 24

4.2.3 *Aspergillus fumigatus* 24
4.2.4 *Zygomycety* 24
5 Vliv biofilmu ve zdravotnictví 26
5.1 Kontaktní čočky 26
5.2 Centrální žilní katetry 27
5.3 Močové katetry 28
5.4 Nitroděložní tělíska 30
5.5 Kloubní protézy 31
5.6 Zubní protézy 32
5.7 Kardiostimulátory 34
6 Vliv biofilmu ve vodních systémech 36
7 Vliv biofilmu v potravinářském průmyslu 38
8 Zabránění tvorbě biofilmu a jeho odstranění 40
9 Závěr 43

Úvod

Biofilm tvoří planktonní buňky, které přilnou nevratně na povrch. Jeden biofilm mohou spolu vytvořit jak bakterie, tak i plísně a kvasinky. Vytvořený biofilm poskytuje buňkám ochranu před nepříznivými vlivy. Biofilmy v prostředí mají nežádoucí vliv, poškozují a znečišťují povrchy a zařízení.

Přítomnost biofilmu ve zdravotnictví je velmi nežádoucí, může způsobit řadu onemocnění, které vedou k životu ohrožujícímu stavu člověka. Mikroorganismy tvořící biofilm se do těla člověka nejčastěji dostávají zavedením umělých materiálů. Umělé materiály poskytují mikroorganismům vhodné prostředí pro tvorbu a zrání biofilmu. Z biofilmu se poté uvolňují jednotlivé buňky a malé shluky buněk, které představují s ohledem na infekční dávku zdravotní riziko.

Počet infekcí způsobených biofilmy, stále roste. Důvodem je stálý posun v medicíně, který umožňuje zavedení nových umělých materiálů do těla člověka, které podporují a vylepšují funkci orgánů a kostry člověka.

1 Biofilm

Biofilm se skládá z imobilizovaných mikrobiálních buněk, které přilnou nevratně na povrch a jedna k druhé jsou zapuštěné v matrici extracelulárních polymerních látek produkovaných těmito buňkami. Tyto buňky dále vykazují odlišný fenotyp, s ohledem na rychlost růstu a transkripci genů od svých planktonních protějšků. Struktura biofilmu závisí na interakcích, jež v něm probíhají mezi fyzikálními a biologickými procesy. V prostředí s vyšší rychlostí proudění, kde dochází k silnému tlaku na odtrhávání, jsou biofilmy hustší a hladší. Naopak ty, které rostou při pomalejším proudění, jsou více porézní. Dříve se vědci domnívali, že biofilm tvoří jen bakterie, ale pozdější studie ukázali, že tuto schopnost mají i kvasinky a plísně. Houby mají často více než jednu formu planktonu, jako jsou sexuální a asexuální výtrusy, sporangie a hyfy. Tyto disperzní formy nejsou jednobuněčné a často plavou ve vodě i vzduchu. Plně vyzrálý biofilm není homogenní, ale má heterogenní strukturu. Hyfy slouží jako kostra biofilmu a hrají klíčovou roli pro tvorbu heterogenní struktury, která chrání mikroorganismy před působením antibiotik a je zdrojem přetrvávající infekce (Amadio *et al*. 2013).

Buňky jsou rozptýleny v matrici nerovnoměrně, s mezerami a vytváří mikrokolonie. Kanálky naplněné vodou jsou propojeny s okolní kapalnou fází a mohou procházet mikrokoloniemi, ale jsou zde o něco tenčí. Biofilm je struktura, která se tvoří jako 3D komplex obsahující intersticiální póry, vodní kanálky s buňkami obvykle zabudovanými v extracelulární matrix (Gutiérrez-Correa *et al*. 2012).

Okolní kapalina obsahuje molekuly živin a dalších nezbytných organických a anorganických látek. Prostřednictvím kanálků a pórů v mikrokoloniích vstupují do biofilmu živiny, které biofilm zásobují a naopak metabolické produkty jsou póry a kanálky odváděny. Z kanálků proudí kapalina póry do nitra větších mikrokolonií a dále se již dostává pouhou difuzí. Ta je většinou účinná pouze do určité hloubky biofilmu. S rostoucí hloubkou proto dochází ke zřetelnému úbytku koncentrace kyslíku a dalších životně důležitých látek. Proto se předpokládá, že růst biofilmu je pomalý vzhledem k omezené dostupnosti živin, zejména ve spodní části biofilmu. Pomalý růst je často doprovázen změnami ve složení povrchu (Douglas *et al.* 2003).

Uvnitř biofilmu dochází ke zvýšené expresi genů podílejících se na syntéze proteinů. Tyto geny kódují ribozomální proteiny. Vzhledem k uchovávání extracelulárních enzymů, univerzální externí trávicí systém je vytvořen tak, aby izoloval a rozpustil částice živin a

umožnil jejich použití jako zdroj energie. Extracelulární matrix (ECM) působí také jako recyklační centrum tím, že drží všechny složky izolovaných buněk k dispozici. To zahrnuje i DNA, která může představovat zásobárnu genů pro horizontální přenos genu. ECM může také sloužit jako zdroj živin, i když některé živiny jsou jen pomalu biologicky rozložitelné. Úplný rozklad všech komponent vyžaduje široké spektrum enzymů (Flemming *et al*. 2010).

Hlavní složkou ECM jsou extracelulární polysacharidy (EPS), které mají celou řadu vazebných míst pro extracelulární enzymy a substráty makromolekul. ECM usnadňuje extracelulární enzymatické reakce. Extracelulární enzymy jsou rozděleny do dvou podskupin podle jejich umístění ve vztahu k buňce. Na enzymy, které zůstávají v kontaktu s buňkou v periplazmatickém prostoru, nebo vázané s ECM. Volný enzym je jakýkoli enzym, který ztratil kontakt s jeho mateřskou buňkou a je součástí prostředí. Extracelulární enzymy mají vliv na degradaci substrátu, rozkládají složité makromolekuly, jejich hydrolýzou vznikají malé fragmenty využitelné buňkami (Wang *et al*. 2009).

1.1 Negativní vliv biofilmu

Biofilmy se vyskytují prakticky všude, kde jsou přítomny mikroorganismy. Kromě přírodního prostředí se vyskytují i v humánním prostředí. Zde svojí přítomností způsobují značné problémy. Znečišťují a poškozují povrchy, na nichž se tvoří. Ve zdravotnictví je jejich přítomnost velmi nežádoucí. Přítomnost biofilmu na zdravotním zařízení, pomůckách a přístrojích může vyvolat řadu onemocnění.

1.2 Pozitivní vliv biofilmu

V mnoha odvětvích průmyslu, jako je biotechnologie a čištění odpadních vod, je naopak přítomnost biofilmu nezbytná. Buňky žijící v biofilmu vykazují rovněž vyšší metabolickou aktivitu, jsou schopny rozkládat vysokomolekulární látky, které jsou pro volně žijící buňky nedostupné. Biofilm poskytuje buňkám ochranu a představuje bariéru, která je izoluje od okolí. Buňky v biofilmu tak mají vyšší odolnost vůči nepříznivým vlivům.

2 Tvorba biofilmu plísní a kvasinek

Nejprve dochází k přichycení na vhodný povrch s následnou adhezí spor. Plísňové spory se udržují na kompatibilním povrchu pomocí několika mechanismů, které zahrnují komplexní interakce fyzikálních a biologických procesů. Fyzikální vlastností je podpora hydrofobnosti, elektrostatický náboj a drsnost povrchu, které jsou důležité v počátečním stupni adheze plísní a kvasinek. Hydrofobnost zaručuje malá třída amfipatických proteinů. Stabilizují přilnavost spor na přírodních a umělých površích, případně generují morfogenetické signály. Proteiny jsou zodpovědné za silné adhezní síly během přilnavosti spor k povrchu (Ramage *et al.* 2011).

Adheze probíhá na povrchu buněk. Adheziny vážou specifické aminokyselinové zbytky nebo cukry na povrchu jiné buňky, nebo podporují vazbu na abiotické plochy. Všechny houbové adheziny sdílejí společnou strukturu tři domén. Část C - terminál adhezinů obsahuje kotvy a spojuje adhezi s buněčnou stěnou. Část N-terminál adhezinů vyčnívá v buněčném povrchu a často obsahuje sacharid nebo peptid vázající doménu. Velká střední část domény z adhezinů je charakterizována přítomností násobku serinu, threoninu a kódované konzervované DNA sekvence (Verstrepen *and* Klis, 2006).

Po adhezi následuje proliferace v celém substrátu, růst, vývoj a nárůst hyf do šířky, tvorba vnitřní struktury a obklopení extracelulárním matrixem. Organizace hyf se liší ve dvou formách. První forma představuje propletené klubko hyf. Druhá forma vytváří kanálky a póry, kterými proudí voda a výživa do hlubších vrstev. Biofilmy vytvořené v pomalu tekoucím proudu, mají nízkou pevnost v tahu, ale biofilmy vytvořené v rychle tekoucím proudu jsou mimořádně pevné a odolné proti mechanickému poškození (Ramage *et al.* 2011).

V poslední fázi dochází k uvolňování buněk nebo buněčných agregátů z biofilmové struktury nebo z povrchu. Četněji jsou uvolňovány jednotlivé buňky a malé shluky, ale oddělují se i velké shluky buněk, které představují s ohledem na infekční dávku zdravotní riziko. Buňky se mohou odpojit jednotlivě z biofilmů v důsledku buněčného růstu a dělení uvnitř biofilmu. Buněčné agregáty nebo až skupiny se mohou odpojit i odpadnout z biofilmu v rychle tekoucím proudu, dojde-li ke změně směru nebo rychlosti toku, což má za následek zvýšení rychlosti eroze buněk z biofilmu. Bylo také prokázáno, že oddělení buněk či agregátů, může být v souvislosti se změnami v koncentraci substrátu (Donlan *and* Costerton, 2002).

2.1 Faktory ovlivňující vznik biofilmu

Biofilm poskytuje buňkám ochranu. Vytvořená biofilmová vrstva z exopolysacharidové matrice obklopující buňky představuje bariéru, která izoluje buňky od okolí. Buňky v biofilmu mají vyšší odolnost vůči fyzikální, chemickým a biologickým faktorům. Mezi fyzikální faktory patří vysychání, mechanické poškození, vyšší teplota, nízké pH, přístup kyslíku. Přítomnost toxických látek, ultrafialového záření, čistících a dezinfekčních prostředků používaných v potravinářském průmyslu patří mezi chemické faktory. Mezi biologické faktory řadíme fyziologický stav buněk v přisedlých populacích, tempo růstu buněčné populace a hustotu buněk v biofilmu. Nižší počet buněk v biofilmu je více citlivý na působení antibiotik, oproti hustě osídlené populaci v biofilmu. Velmi důležitými faktory pro člověka je odolnost biofilmu vůči imunitnímu systému a antibiotikům (Ramage *et al*. 2012).

2.2 Regulace tvorby biofilmu

Některé buňky se z kolonií odlučují, přecházejí do planktonního stavu a mohou kolonizovat další části povrchu. Pravděpodobně podobnou příčinou tohoto chování je zvyšující se konkurence mezi buňkami v biofilmu. V hustě osídlených biofilmech je spolupráce mezi jednotlivými buňkami prostřednictvím quorum sensing. Quorum sensing je založen na tvorbě, vylučování a detekci malých signálních molekul, které se hromadí v extracelulárním prostředí, jejichž koncentrace kolísá. Signální molekuly jsou obvykle specifické pro druh nebo kmen a je zde vysoký stupeň strukturální rozmanitosti mezi signálními molekuly produkovanými různými mikroorganismy. Je-li signál, který se hromadí na dostatečně vysoké koncentraci, quorum sensing je aktivován v místní populaci buněk a dochází k expresi genu (Hogan, 2006).

3 Metody detekce biofilmu

Základní rozdělení mikrobiologických metod je na přímé a nepřímé. Přímá diagnostika je založena na průkazu přítomného mikroorganismu nebo jeho částí (antigen, DNA). Nepřímou diagnostikou se prokazuje specifická imunitní reakce proti danému mikroorganismu. Mezi metody přímé diagnostiky patří mikroskopické a kultivační vyšetření, biochemické, imunochemické a genetické testy. Metody nepřímé diagnostiky rozdělujeme na precipitaci, aglutinaci, vazbu komplementu, neutralizaci a metody se značenými složkami (ELISA, Western blot), (Votava *a kol*, 2010).

3.1 Mikroskopické metody

Mikroskopické metody patří mezi základní metody k pozorování přítomnosti mikroorganismů.

3.1.1 Skenovací elektronová mikroskopie

U skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) je obraz tvořen pomocí sekundárního signálu. Velkou předností SEM v porovnání se světelným mikroskopem je jeho velká hloubka ostrosti (Michler, 2008).

Ramage *et al.* (2002) pozorovali vliv Farnesolu na tvorbu biofilmu kvasinky druhu *Candida albicans*. Tvorba biofilmu na plastových krycích sklíčkách byla sledována pomocí SEM. Farnesol je quorum sensing molekula, která inhibuje filamentaci v *C. albicans*. Filamentace a quorum sensing jsou považovány za důležité faktory pro tvorbu biofilmu. Vytvořené biofilmy na plastových krycích sklíčkách byly ošetřeny předem připravenými koncentracemi Farnesolu (0, 3, 30 a 300 μM) a inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Poté byly biofilmy promyty sterilním fosfátovým pufrem (PBS) a fixovány formaldehydem a glutaraldehydem. Vzorky byly opláchnuty fosfátovým pufrem, po uplynutí 30 minut byly dehydratovány alkoholem a nakonec byly vysušeny na vzduchu v exsikátoru. Vzorky pak byly pokryty 40 % zlatem a 60 % palladiem. SEM obrazy poskytly cenný pohled do strukturální organizace biofilmů. Biofilmy vytvořené *C. albicans* se skládaly převážně z kvasinkových buněk a pseudohyf. Ošetřením *C. albicans* různými koncentracemi Farnesolu byl prokázán jeho vliv na tvorbu biofilmu. Buňky ošetřené Farnesolem s koncentrací 300 μM nevytvářely biofilm. Biofilmy vytvořené za přítomnosti Farnesolu s koncentrací 3 a 30 μM byly hustší a byly tvořeny z pseudohyf a hyf.

3.1.2 Fluorescenční mikroskopie a skenovací konfokální laserová mikroskopie

Chandra *et al.* (2001) prokázali pomocí kvasinek *Candida albicans* tvorbu biofilmu na dvou rozdílných kultivačních materiálech. Tvorba biofilmu probíhala ve třech odlišných vývojových fázích. Fluorescenční a skenovací konfokální laserová mikroskopie potvrdila, že biofilmy *C. albicans* mají velmi různorodou strukturu složenou z buněčných a nebuněčných prvků, uložených v extracelulární matrici. Byly použity dva kultivační materiály. Biofilm byl vytvořen jak na polymethylmethakrylovém materiálu, který má hrubší strukturu přispívající k lepšímu růstu biofilmu, tak na silikonovém elastomeru s hladší strukturou. Sklíčka s materiály byly ponořeny do suspenze kvasinek *C. albicans* a inkubovali se 90 min při 37°C. Sklíčka byla poté promyta fosfátovým pufrem (PBS) a inkubována v YNB (kvasnicové médium s dusíkatým základem). Sklíčka, která neobsahovala kmeny tvořící biofilm, sloužila jako kontroly.

3.1.2.1 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie využívá specifického označení buněčných složek a umožnuje tak pozorování struktur uvnitř živého vzorku v reálném čase (Huang *et al.* 2009). Biofilmy na předem připravených sklíčkách byly obarveny barvivem Calcoflour-White, který fluoreskuje v UV oblasti 432 nm. Barvivo se vázalo na chitin a beta-glukanon a zvýrazňovalo buněčnou stěnu. Obarvené biofilmy byly zkoumány pod fluorescenčním mikroskopem (Chandra *et al.* 2001).

Autoři zaznamenali, že tvorba biofilmu probíhala ve třech vývojových fázích. V časné fázi na povrchu polymethylmethakrylovém materiálu byly přítomny blastospory a po uplynutí 3 až 4 hodin se objevily mikrokolonie. Ve střední vývojové fázi vznikl převážně nebuněčný materiál, pokrývající mikrokolonie. Mlhavý vzhled získaný obarvením poukazoval na to, že buněčná stěna je složena převážně z polysacharidů. Během poslední fáze se doba inkubace zvyšovala a byl zcela dotvořen extracelulární matrix. Na povrchu silikonového elastomeru zjistili autoři podobný růst biofilmu, ale rozdíl byl v časné fázi vývoje, kde bylo prokázáno více blastospor (Chandra *et al.* 2001).

3.1.2.2 Skenovací konfokální laserová mikroskopie

Skenovací konfokální laserová mikroskopie (CSLM) je vhodná metoda, která zachovává neporušenou strukturu biofilmu. Biofilm byl převeden z předem připravených sklíček do jamkových destiček, které obsahovaly PBS médium se sondami FUN-1 (cytoplazmatická fluorescenční sonda) a s ConA (konkavalium a Alexa Fluor 488 konjugát).

Sonda FUN-1 zobrazovala oranžovočervenou válcovou intracelulární konstrukci metabolicky aktivních buněk. ConA byla navázána na glukosu a se zbytky manosy buněčné stěny způsobovala zelenou fluorescenci. Hloubka byla měřena v pravidelných intervalech po celé šířce zařízení v horizontálních řadách (XY) optických řezů (Chandra *et al.* 2001).

Snímky biofilmu byly zobrazeny jednotlivě nebo rekonstruovány trojrozměrně (v 3D projekci). Snímky byly použity pro stanovení tloušťky a architektury biofilmu. Intenzivní zelená fluorescence v důsledku vazby ConA na polysacharidy poukazovala na buněčnou stěnu, červená barva v důsledku FUN -1 barvení lokalizovala husté agregáty v cytoplazmě metabolicky aktivních buněk. Zatímco žluté plochy představovaly dvojí zbarvení, projekční analýza uskutečněná CSLM odhalila heterogenní strukturu biofilmu s tenkými oblastmi metabolicky aktivních buněk s extracelulárním matrixem (Chandra *et al.* 2001).

3.2 Genetické testy

Patří mezi modernější metody, které jsou finančně náročné při pořizování přístrojů a materiálů, ale jejich investice se dlouhodobým chodem laboratoře vrátí.

3.2.1 Northern blot analýza

Northern blot analýza je metoda, která slouží k identifikaci specifických sekvencí RNA, ve kterých jsou molekuly RNA separovány elektroforézou, přeneseny na nitrocelulózu a identifikované vhodnou sondou (Nielsen *and* Josefsen, 2011).

Ramage *et al.* (2002) provedli extrakci RNA z biofilmu, který tvořily kvasinky druhu *Candida albicans*. Médium, na kterém biofilm vyrostl, byl potažen Farnesolem o koncentraci 30 μM. Tato koncentrace Farnesolu byla zvolena, protože ještě měla vliv na tvorbu biofilmu, ale zároveň došlo k dostatečné obnově buněčné hmoty pro extrakci RNA. Buňky byly promyty PBS, poté peletovány, resuspendovány a mechanicky porušeny skleněnými kuličkami v mini-kuličkovém šlehači. Ribonukleová kyselina (RNA) byla oddělena od ostatních buněčných zbytků pomocí bromochloropropanu. RNA byla vysrážena isopropanolem a přenesena na nylonové membrány. Sonda HWP1, která kóduje protein stěny hyf, byla připravena pomocí PCR a označena náhodnou penetrací (systém označující náhodné primery DNA) a hybridizace byla provedena s použitím Rapid - Hyf pufru. Po hybridizaci byly bloty promyty za vysoce přísných podmínek. Výsledky ukázaly, že buňky ošetřené Farnesolem mají nižší hladiny HWP1 RNA, než buňky pěstované v nepřítomnosti Farnesolu. Hladiny korelovaly s různou morfologií buněk (kvasinky nebo

hyfy). Také bylo zjištěno, že úroveň exprese HWP1 je nižší ve 48 h biofilmu než v 24 h biofilmu.

3.2.2 Denaturační gradientová gelová elektroforéza

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) patří mezi molekulární metody, které jsou založeny na analýze jednotlivých buněk, nabízející možnost analyzovat mikrobiální komunity v plné rozmanitosti (McAuliffe *et al.* 2005).

Möhlenhoff *et al.* (2001) pozorovali růst plísní na zdi a schopnost plísní zde tvořit biofilmy. Biofilm tvořily plísně rodu *Penicillium, Aspergillus* a *Cladosporium*. Růst biofilmu byl kontrolován za použití mikroskopu před extrakcí DNA. Extrakce DNA byla provedena pomocí Chelexu podle přesně daného postupu. Získaná DNA byla amplifikována a detekována DGGE. Jednotlivé DNA získané z izolátů vykazovaly podobnou pozici v DGGE, i když tyto vzorky DNA byly odvozeny z různých druhů plísní. Jejich podobná sekvence může tuto skutečnost vysvětlovat. To je dáno tím, že buněčná stěna představuje komplex polysacharidů, proteinů a pigmentů a některé druhy hub tvoří husté buněčné stěny s vysokým obsahem fenolu a melaninu, které mohou inhibovat PCR. Tyto charakteristické rysy typické pro plísně způsobují problémy během extrakcí nukleových kyselin.

3.2.3 Polymerázová řetězová reakce s polymorfismem délek restrikčních fragmentů

Metoda využívá rozdílu ve velikosti fragmentů u různých jedinců. Rozdíl se detekuje pomocí sond specifických pro polymorfní oblast a využívá je jako signální znaky (Rosypal *a kol*., 2000).

Li *et al*. (2003) testovali potenciální omezení genotypů na tvorbě biofilmu a zkoumali rozsah fenotypové rozmanitosti mezi kvasinkami druhu *Candida albicans*. Bylo použito 115 kmenů. Tyto kmeny byly izolovány ze tří zdrojů: 47 vzorků z dutiny ústní u zdravých pacientů, 31 z životního prostředí a 37 z vagíny pacientů postižené kandidózou. Pro každý kmen byla tvorba biofilmu kvantifikována pomocí mikroskopické metody. Tyto výsledky naznačily rozsáhlou rozmanitost ve tvorbě biofilmu mezi kmeny v rámci stejného klonu nebo klonální linie v přírodních populacích. Genotyp byl získán ze všech 16 polymorfních restrikčních míst. Tyto polymorfní místa byla rozdělena mezi devět fragmentů DNA amplifikovaných pomocí PCR a štěpených čtyřmi základními restrikčními enzymy. Produkty PCR a restrikčního štěpení byly podrobeny elektroforéze a obarvené ethidium bromidem.

Bylo zjištěno celkem 56 unikátních multilokusových genotypů mezi 115 kmeny. Celkově lze říci, že sdílené genotypy byly rozptýleny v celém phenogramu, bez ohledu na zdroj izolace. Nicméně, byly přítomny i malé shluky zdrojově specifických genotypů nebo genotypových skupin. Výsledky prokázaly, že vzorky pacientů s vaginální kandidózou měly největší genotypovou rozmanitost. Poté následovaly vzorky z životního prostředí. Nejnižší genotypovou rozmanitost měly vzorky od zdravých pacientů z dutiny ústní.

4 Nejdůležitější kvasinky a plísně tvořící biofilm

4.1 Kvasinky

4.1.1 *Candida albicans*

Jedná se o eukaryotní mikroorganismy, které patří mezi patogeny. *Candida albicans* způsobují bolestivé povrchové infekce, jako je například vaginitida u jinak zdravých žen, silné povrchové infekce v ústech a jícnu u pacientů s HIV a život ohrožující krevní infekce u pacientů na jednotce intenzivní péče. Krevní infekce jsou velmi nebezpečné u těch pacientů, kteří procházejí chemoterapii, nebo u pacientů po transplantaci orgánů a kostní dřeně (Sudbery *et al.* 2004). Kvasinky mají tvar kulovitý až protáhlý. *C. albicans* tvoří blastokonidie, hyfy, pseudohyfy, chlamydokonidie a zárodečné klíčky. Oválné blastokonidie měří 3 až 6 μm a pučí z nich dceřiné buňky. Pseudohyfy jsou tvořeny pučícími buňkami, které se protahují a zůstávají spojeny. Chlamydokonidie jsou kulaté a umístěny na konci pseudohyf. Zárodečné klíčky vytváří tenké trubičkové útvary bez zaškrcení v místě, kde opouštějí mateřskou buňku. Jejich rozmnožování probíhá pučením (Votava *a kol.* 2003).

Jako běžné půdy pro kultivaci se používá nejčastěji krevní agar nebo Sabouraudův dextrosový agar (SDA). Kultivace na krevním agaru a SDA probíhá při 37°C po dobu 2-3 dní. Na krevním agaru rostou jako malé, kulaté, bílé kolonie, případně s tvorbou pseudohyf, které jsou sotva viditelné na povrchu agaru. *C. albicans* také obvykle produkuje "kvasnicový" zápach. Na Sabouraudově agaru vytvářejí bílé až krémové, hladké kolonie s matným povrchem.

Jejich biochemická aktivita rovněž slouží k jejich identifikaci od ostatních kandid. Mezi biochemické aktivity *C. albicans* patří fermentační a asimilační procesy. Díky tomu je *C. albicans* schopna odolávat nižšímu pH, které vzniká během těchto procesů. Při fermentačním procesu produkuje plyn CO_2 (Ellis *et al.* 2007).

4.1.2 *Candida tropicalis*

Candida tropicalis je hlavní příčinou sepse a diseminované kandidózy, a to zejména u pacientů s lymfomem, leukémií a diabetem. Jedná se o druhý nejčastější patogen po *C. albicans.* Kvasinky mají tvar kulovitý až protáhlý a mnohé z nich jsou propojeny. Chlamydokonidie tvoří jen vzácně a zárodečné klíčky neobsahuje (Ellis *et al.* 2007).

C. tropicalis na SDA při 37°C vyrůstají v bílých až krémových, hladkých kolonií (Pfaller *et al.* 1996).

Mají jedinečnou biochemickou aktivitu. Jejich metabolismus je schopen využít alkany a mastné kyseliny jako zdroj uhlíku a energie. Mnoho z oxidačních enzymů, které degradují tyto substráty, jsou vysoce regulovatelné. *C. tropicalis* má ve srovnání s jinými organismy výhodu v produkci heterogenních proteinů (Haas *et al.* 1990).

4.1.3 *Candida glabrata*

C. glabrata se vyskytuje jako běžný komenzál tělních dutin, při snížené imunitě způsobuje řadu onemocnění, jako jsou infekce močových cest nebo závažnější endokarditidy a meningitidy. Kvasinky mají vejčitý až elipsoidní tvar, lze pozorovat i začínající blastokonidie. *C. glabrata* netvoří pseudohyfy ani zárodečné klíčky (Ellis *et al.* 2007).

Na SDA agaru při 37°C *C. glabrata* vytváří bílé až krémovité kolonie. Typický je jejich velmi pomalý růst, proto je nutné je nechat kultivovat nejméně 2-3 dny (Pfaller *et al.* 1996).

Mezi jejich biochemickou aktivitu se řadí asimilace cukrů a sekundární rezistence k flukonazalu. Rezistence k flukonazalu u *C. glabrata* je závažná především u léčby HIV pacientů, kde flukonazal slouží jako běžný lék při tomto onemocnění (Hitchcock *et al*. 1993).

4.1.4 *Cryptococcus neoformans*

Rod *Cryptococcus* způsobuje onemocnění kryptokokózu, které se vyskytuje u pacientů se sníženou imunitou. *C. neoformans* vytváří kulovité až protáhlé kvasinky, pseudohyfy nevytvářejí. Buňky se brzy po rozdělení od sebe oddělují. *C. neoformans* tvoří hutné polysacharidové pouzdra, které se začnou zvětšovat, jakmile se kvasinka dostane do organismu. Schopnost kvasinky se zvětšovat je dána tím, že připojuje na vnější okraj polysacharidového pouzdra nové a nové molekuly sacharidů. *C. neoformans* produkuje karotenoidní pigmenty (Votava *a kol.* 2003).

Na SDA agaru při 37°C vytvářejí hlenovité až slizké kolonie, které mohou být červeně, oranžově nebo žlutě pigmentované. Zato mladé kolonie jsou většinou bez pigmentace a krémovitě zbarvené. *C. neoformans* existuje v řadě sérotypů. Nejdůležitější sérotyp je *C. neoformans var. neoformans* (sérotyp D). Kreatinin dextrózový agar s bromothymolovou modří (CDBT) je médium pro určení jednotlivých sérotypů.

C. neoformans var. neoformans roste na CDBT při 37°C v jasně červených kolonií a rub kolonie je po 5 dnech jasně oranžový (Ellis *et al.* 2007).

Rod *Cryptococcus* je schopen asimilovat glukózu, maltózu a sacharózu, negativně asimiluje dusičnany a laktósu (Carter *and* Cole 1990).

4.1.5 *Trichosporon asahii*

Tyto kvasinky jsou dobře známy jako původci bílé piedry, ale také patří mezi oportunní patogeny, které způsobují hluboce zakořeněné a velmi šířené infekce u imunokompromitovaných pacientů. Kvasinka *T. asahii* je charakterizována přítomností přepažených hyalinních hyf, pseudohyf, blastokonidií a tvoří oválné nebo obdélníkové arthrokonidie (spory vytvořené segmentací již existujících hyf; Silvestre *et al*. 2010).

Kolonie rostou na SDA agaru při 37°C po dobu 10 dní. *T. asahii* vytváří bílé až krémovitě zbarvené kolonie s voskovým vzhledem, kde jsou viditelné radiální rýhy a nepravidelné záhyby (Taj-Aldeen *et al*. 2009).

4.2 Plísně

4.2.1 *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum je všudypřítomná, anamorfní houba, která napadá širokou škálu hostitelů a způsobuje široké spektrum infekcí. *F. oxysporum* způsobuje povrchové, lokálně invazivní nebo diseminované infekce, vyskytující se téměř výhradně u těžce imunokompromitovaných pacientů. Druhy fusarií obvykle produkují makrokonidie i mikrokonidie ze štíhlých fialid. Makrokonidie jsou hyalinní, dvou až více buněčné, vřetenovité až srpovité, většinou s protáhlými buňkami a obsahují stopkovité bazální buňky. Mikrokonidie jsou jedno nebo dvou buněčné, hyalinní, menší než makrokonidie, hruškovité, vřetenovité až vejcovité, rovné nebo zakřivené. Chlamydospory mohou být přítomny nebo chybí (Nelson *et al*. 1994).

Ke kultivaci *F. oxysporum* se používá bramborový dextrózový agar (PDA), kultivace se provádí při 25°C po dobu 7 dní. Kolonie *F. oxysporum* jsou obvykle rychle rostoucí. Barva mycelia může mít různé odstíny – od bělavé do žluté, růžové, červené až fialové barvy (Srivastava *et al.* 2011).

4.2.2 *Aspergillus niger*

Druh *Aspergillus niger* je častou příčinou invazivních mykotických infekcí u imunokompromitovaných pacientů a je spojen s alergickým bronchopulmonálním onemocněním a mykotickou keratitidou. Kolonie se většinou skládají z husté plsti vztyčených konidiofor. Konidie jsou jednobuněčné, s hladkými nebo drsnými stěnami. Fialidy nesou řetízky různě pigmentovaných konidií (Gupta *et al.* 2012).

Ke kultivaci se používají Czapek DOX agar (CZ), Czapek agar s kvasnicovým extraktem (CYA) a bramborový dextrózový agar (PDA) a kultivuje se při 25°C po dobu 7 dní. Kolonie patří mezi rychle rostoucí. Na CZ agaru *A. niger* vytváří bílé až žluté kolonie v jejich středu umístěnou s vrstvou tmavě hnědých až černých konidií. Na PDA agaru *A. niger* tvoří sametově bílé mycelium, které se rychle stává černé s tvorbou konidií. Rub mycelia je bílý. Na CYA agaru roste v bílých koloniích, s lehce sametovými černými tečkami, které způsobují vyrůstající konidie. Rub mycelia je lehce oranžový (Gupta *et al.* 2012).

4.2.3 *Aspergillus fumigatus*

A. fumigatus je důležitý lidský patogen a je nejčastější příčinou všech forem invazivní a ne-invazivní aspergilózy. *A fumigatus* patří mezi saprofytické houby, které hrají zásadní roli v recyklaci uhlíku a dusíku v životním prostředí. Vykazuje hojnou sporulaci. Spory uvolněné do atmosféry mají malou velikost, a tak se snadno dostanou do plicních alveolů. *A. fumigatus* vytváří hustou spleť konidiofor. Konidie vytvářejí dlouhé řetězce a mají kulovitý tvar (Latgé, 1999).

Na CZ agaru při 25°C po dobu 6 až 8 dní tvoří modrozelené semišové mycelium. *A. fumigatus* patří mezi termofilní druhy a roste i při teplotách do 55°C. Spodní strana mycelia je světlá nebo nazelenalá (Latgé, 1999).

4.2.4 *Zygomycety*

Zygomycety způsobují systémové mykózy a ve velkých cévách tvoří rychle rostoucí živý tromb, který způsobuje embolii a následnou smrt. *Zygomycety* se skládají z hub, které produkují neseptované hyfy. Jejich nepohlavní rozmnožovací fáze je charakterizována produkcí sporangiospor, které se tvoří ve sporangiích. Sexuální reprodukční fáze se vyznačuje tvorbou zygospor. Zygosporangium které odpovídá za zbarvení a povrchovou strukturou je charakteristické pro každý izolát. Pohlavní rozmnožování může proběhnout mezi jedním izolátem nebo vyžaduje páření mezi opačně orientovanými izoláty (Ribes *et al.* 2000).

Zygomycety se nejčastěji kultivují na sladinkovém agaru (SL) při 25°C po dobu 6 dnů, kde kolonie vytvářejí kožíškovitý vzhled mycelia se stejnoměrným povrchem se zbarvením od hnědošedé po šedočernou. Při růstu na Petriho miskách, dokáže mycelium až nadzvednout víčko misky (Votava *a kol.* 2003).

5 Vliv biofilmu ve zdravotnictví

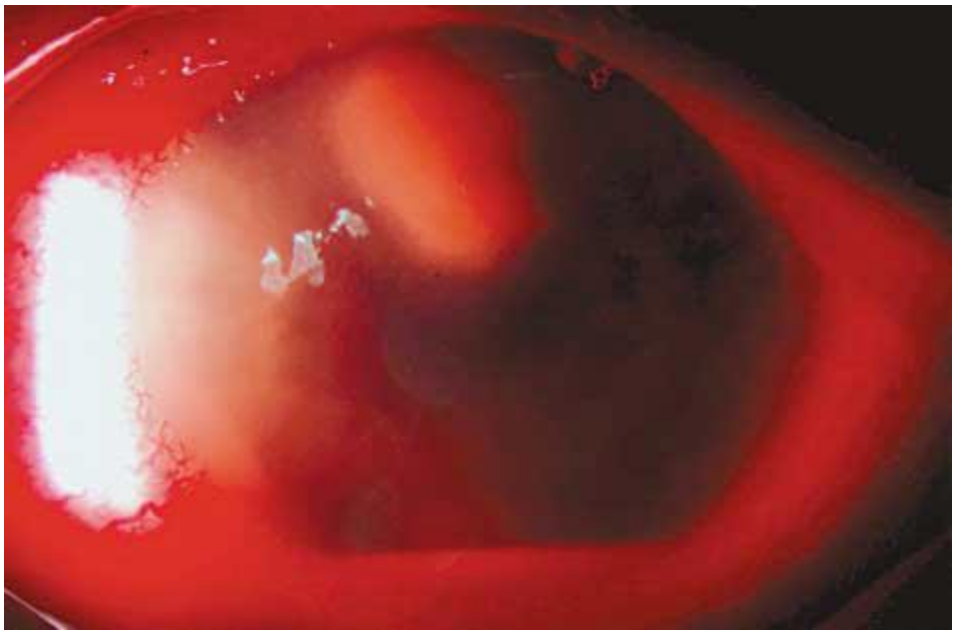
Moderní technologie umožnila využití širších a novějších lékařských zařízení. Kombinace stárnoucí lidské populace a rostoucí počet zavedených umělých materiálů do lidského těla, pravděpodobně stupňuje výskyt infekčních onemocnění. Nejméně polovina všech případů nozokomiálních infekcí je spojena s používáním zdravotnických materiálů. Tyto infekce mohou být katastrofální. Zahrnují potenciálně život ohrožující systémové infekce a biofilmy způsobují poruchu zařízení. Zdravotní důsledky související se vzniklou infekcí, mohou být pro zdravotní stav člověka katastrofální. Různé mikroorganismy, včetně kvasinek rodu *Candida* kolonizují povrchy a vytvářejí biofilmy, ale i nepříznivě ovlivňují funkci zavedeného materiálu (Ramage *et al.* 2006).

5.1 Kontaktní čočky

Mezi nejčastější houby tvořící biofilm na kontaktních čočkách patří kandidy a fusária. Kontaminace oka z kontaktních čoček biofilmem se nejprve projevuje zarudnutím oka, nepříjemným trháním v oku, pocitem cizího tělesa v oku a to vše je spojené s pálením a bolestí oka. Zpravidla dochází ke zhoršenému vidění a pokračuje rozvojem oční keratitidy, kterou nejběžněji způsobuje rod *Fusarium*. Při keratitidě se nejčastěji utvoří infiltrát na rohovce, který je definován jako vřed. U některých pacientů byla zaznamenána tvorba hypopyonu (obr. 1). Jedná se o nahromadění hnisu v přední komoře oka. Napadení plísní se objevuje v souvislosti s osobní predispozicí nebo s nevhodnou péčí o kontaktní čočky (Alfonso *et al.* 2006).

Prudký nárůst toho onemocnění nastal s uvedením nových materiálů měkkých kontaktních čoček na trh, u nichž se projevila přilnavost k určitým patogenům. Mezi tyto materiály patřily silikonové hydrogelové čočky, které představují typ čoček s různými monomery hlavních řetězců polymeru a mají výrazně lepší propustnost kyslíku ve srovnání s tradičními hydrogely. K tvorbě biofilmu na kontaktních čočkách přispívá i nedokonalá hygiena při péči o kontaktní čočky. Mezi tyto faktory patří neuzavírání lahví s roztokem pro kontaktní čočky nebo dolévání roztoku vodou z vodovodu. Takto znehodnocené roztoky neodolávají působení plísní a kvasinek čímž dochází ke vzniku biofilmu. Rod *Fusarium* a *Candida* tvořily biofilmy na různých typech testovaných čoček, ale byly zaznamenány výrazné rozdíly v architektuře a v tloušťce biofilmu, v morfologii hyf a metabolické aktivitě mezi rody *Fusarium* a *Candida*. I když roztoky pro kontaktní čočky jsou více účinné proti planktonním buňkám rodu *Fusarium* a *Candida*, tyto roztoky byly méně účinné proti biofilmu

tvořeným rodem *Fusarium* a naprosto neúčinné proti biofilmům tvořeným rody *Candida* (Imamura *et al*. 2007).



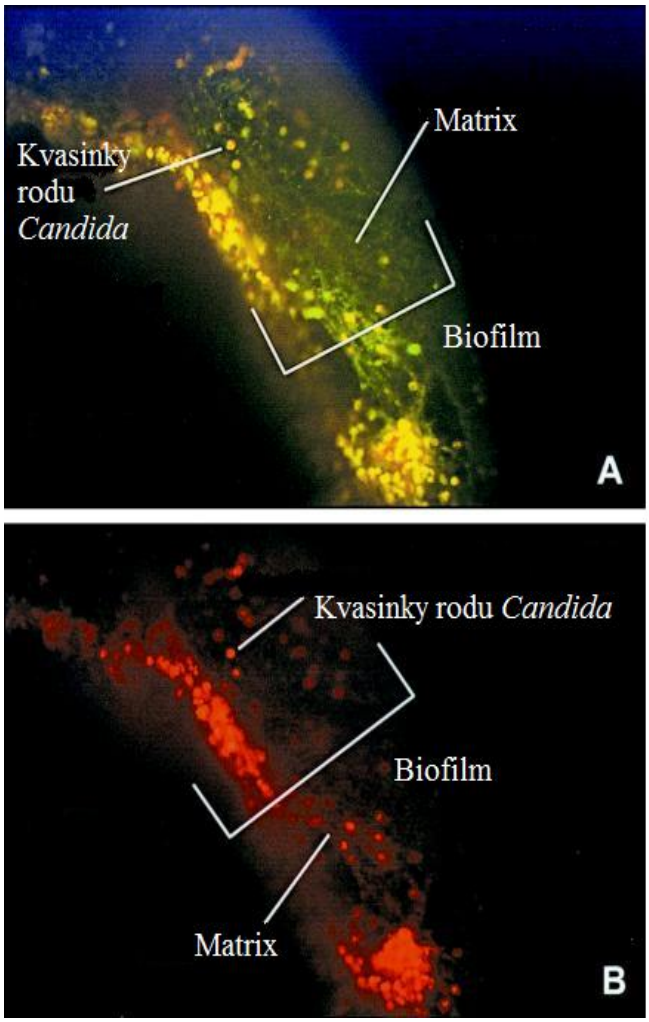
Obrázek 1: Centrální stromální infiltrace a okolní zánětlivý prsten s hypopyonem (Alfonso *et al.* 2006).

5.2 Centrální žilní katetry

Centrální žilní katetry se staly nezbytnou součástí podpůrné péče o pacienty, kteří postoupili intenzivní chirurgickou a lékařskou léčbu. Většina cévních infekcí katetru je způsobena kvasinky rodu *Candida*, které jsou spojeny s vysokou mírou úmrtnosti. Úspěšná léčba těchto infekcí je terapeutickým problémem, který vyžaduje odebrání katetru u většiny případů. Mezi důležité faktory pro rozvoj biofilmu na katetru se řadí složení materiálu, ze kterého je katetr vyroben, průtok kapaliny a odolnost mikroorganismu v biofilmu proti antiinfekčním lékům a imunitnímu systému jedince. Katetr vyrobený z latexu je ve srovnání s polyvinylchloridem (PVC) pro tvorbu biofilmu výhodnější (Andes *et al*. 2004).

Nejčastější onemocnění způsobené z biofilmu utvořeného na katetru je kandidémie. Její vznik u pacienta podporuje oslabená imutina, malignita, hematologická porucha, kritický stav, diabetes mellitus a nízký počet neutrofilů. Neutropenie je pro pacienty se zavedeným cévním katetrem nejrizikovějším faktorem pro rozvoj nozokomiální infekce krevního řečiště a následné smrti. Studie prokázaly tvorbu biofilmu na cévních centrálních katetrech ve 3D struktuře, skládající se z husté sítě kvasinek a vláknitých buněk, vložených v extracelulární

matrix podobně jako u in vitro. Ale maximální tloušťka matrice biofilmu in vivo byla vyšší než u in vitro (obr. 2; Kojic *and* Darouiche, 2004).



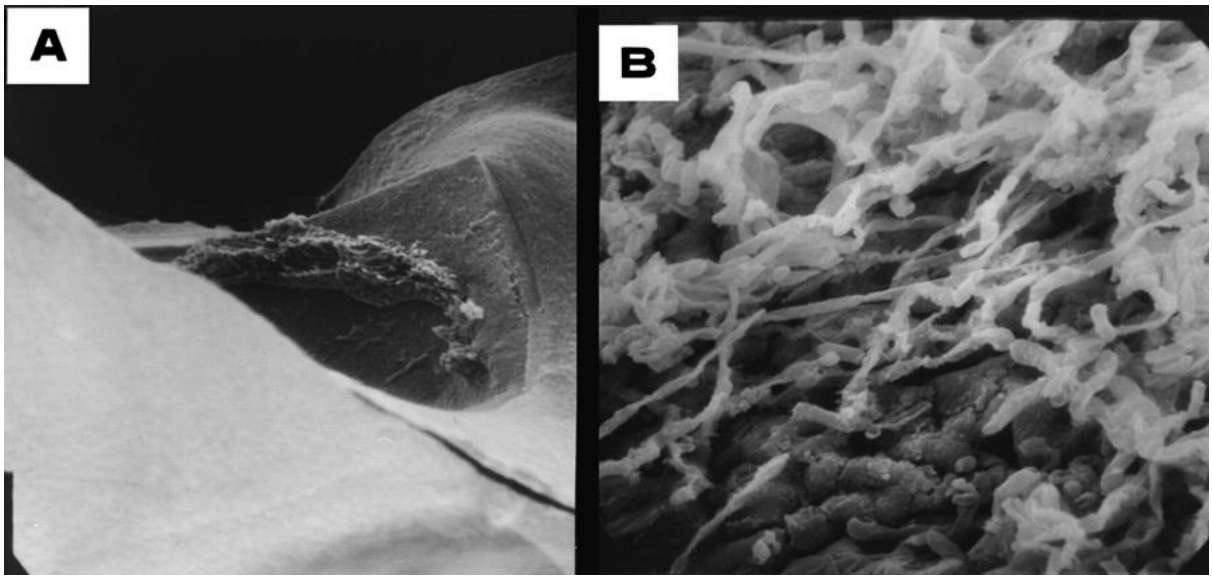
Obrázek 2: Biofilm tvořený kvasinkami rodu *Candida* na stěně katetru značeného pomocí fluorescenčních barviv. A) vizualizace červené a zelené fluorescence B) vizualizace červené fluorescence. Červené fluoreskující kvasinky jsou metabolicky aktivní (upraveno dle Andes *et al*. 2004).

5.3 Močové katetry

Močové katétry jsou široce používány pro hospitalizované pacienty a jsou často spojeny s vysokou mírou infekce močových cest. To přispívá nejen ke zvýšené nemocnosti a úmrtnosti, ale i k delšímu pobytu v nemocnici a zvýšení nákladů na zdravotní péči. Močové katetry poskytují potřebnou plochu pro tvorbu biofilmu a jsou v současné době zodpovědné za významné procento vzniku kandidémie. Důsledkem infekce močových cest a kandidémie je léze na močovém měchýři, včetně eroze, uretritidy, vzniku abscesů na ledvinách a následné

smrti. Bylo používáno několik různých metod, aby se zabránilo nozokomiální infekci močových cest. Nejčastější a nejdéle používanou metodou je drenážní systém, který tuto infekci snižuje. Dříve se nejběžněji jako preventivní opatření používalo impregnování močových katetrů stříbrem nebo antibiotiky. Ovšem toto opatření není dostatečně odolné proti biofilmům, které vytvoří kvasinky rodu *Candida.* Katetry vyrobené z PVC více přispívají k tvorbě biofilmu, než katetry vyrobené ze silikonového materiálu (Hachem *et al.* 2009). Vzniklé onemocnění vyžaduje pro jejich účinnou léčbu odstranění katetru. Bohužel, v mnoha případech není odstranění možné, vzhledem ke stavu pacienta a anatomické poloze. Biofilm chrání buňky před působením antibiotik, což vede k přetrvávání infekce (Ramage *et al.* 2006).

Přilnavost kvasinek je považována za klíčový atribut virulence, protože umožňuje, aby kvasinky přilnuly na různá místa v těle a zahájily proliferaci. Mechanismy, které umožňují přilnavost kvasinek a tvorbu biofilmu, jsou důležité zejména v místech, kde dochází k odlupování buněk společně s tvorbou sekretu nebo průtoku kapaliny. V počáteční fázi infekce dochází ke kolonizaci hostitelské tkáně kvasinkami. Tvořící hyfy nebo pseudohyfy, které vytvářejí vláknité struktury na povrchu tkáně a zahajují tvorbu biofilmu. Ve druhé fázi začíná invaze do tkání. Hyfy pronikají vrstvami buněk ve tkáni. Ve třetí a čtvrté fázi pronikají kvasinky tkání až do cév a dochází ke vstupu do krevního řečiště. V páté, poslední fázi kvasinky z krevního řečiště přilnou ke stěně jiné cévy a zahájí proces pronikání a kolonizace v jiné tkáni (obr. 3; Fisher *et al*. 2011).



Obrázek 3: Biofilm na katetru, který je zavedený do močového měchýře. A) průřez katetru močového měchýře s přetrvávající kandidurii B) masa hyf *C. albicans* v močovém katetru (upraveno dle Fisher *et al.* 2011).

5.4 Nitroděložní tělíska

Použití nitroděložních tělísek (IUD) je vysoce efektivní v prevenci těhotenství a z pohledu na ekonomiku se jedná o jednu z nejlevnějších dostupných antikoncepcí. IUD patří i mezi nejpopulárnější metody antikoncepce v dnešním světě. Více než 80 milionů žen používá IUD jako antikoncepci po celém světě a účinnost je srovnatelná se sterilizací vejcovodů. Nedávné hodnocení naznačují, že celkové riziko vzniku zánětlivého pánevního onemocnění s používáním IUD je nižší, než se dříve předpokládalo. Toto tvrzení je potvrzeno pouze v oblastech s vyhovující lékařkou péčí i možností dodržet aseptické podmínky ve zdravotnictví. Zároveň i v oblastech, kde je nižší výskyt sexuálně přenosných infekcí a dostatečných prostředků k zajištění vyhovující osobní hygieny. I přes tyto informace se přesto doporučuje zavádět nitroděložní tělísko po dobu 5 let z důvodu zajištění bezpečnosti. Možný výskyt zánětlivého pánevního onemocnění je v oblastech vývojových zemí, kde těchto podmínek není dosaženo (Pal, 2005).

Růst bakterií, plísní a kvasinek podporuje teplota těla a vaginální prostředí. Vlákno připojené k IUD je nejspíš jedním z faktorů uskutečňující mikrobiální migraci z pochvy do dělohy. Předchozí studie ukázaly menší tvorbu biofilmu u IUD, které nemají vlákno vyčnívající do děložního krčku. Kromě toho bylo nejvyšší mikrobiální zatížení na nitroděložním tělísku, kde distální část vlákna byla přímo vystavena vaginální flóře.

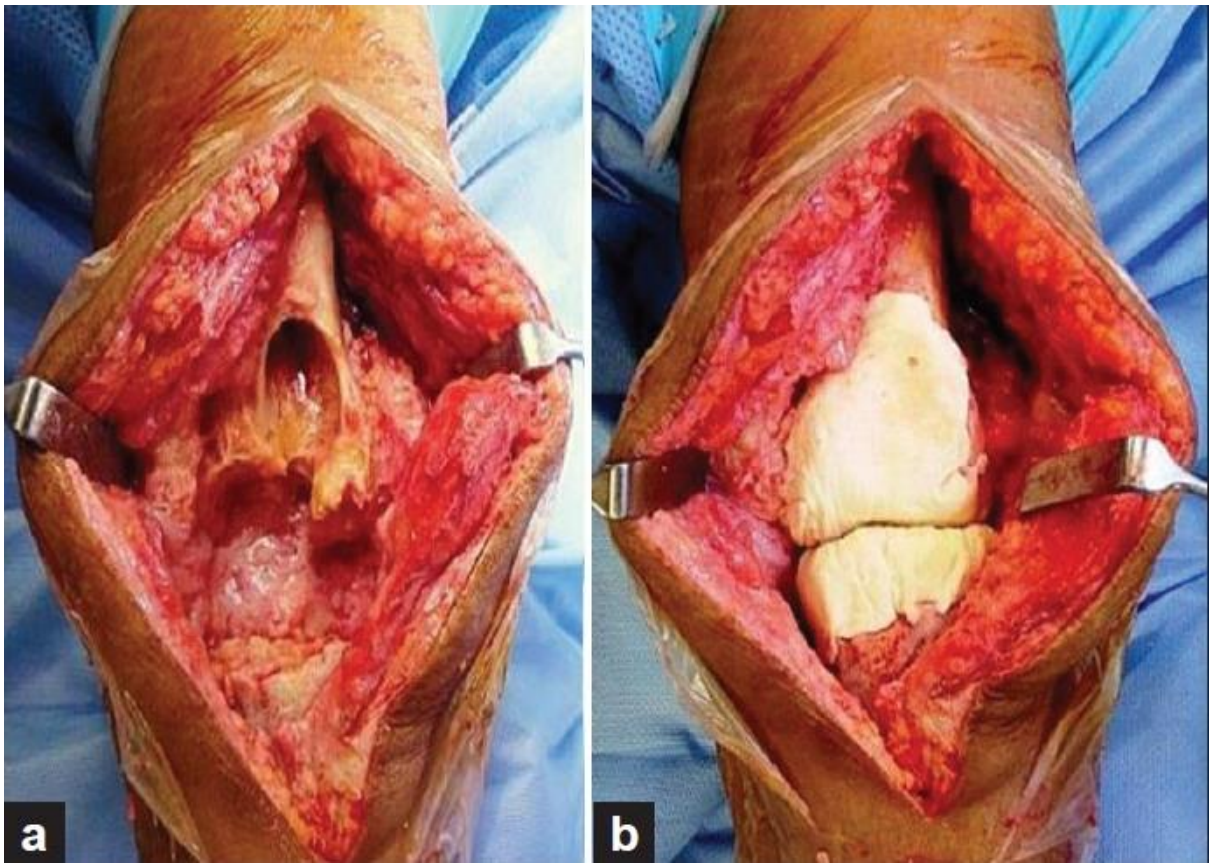
Přítomnost IUD poskytuje pevný povrch pro kolonizaci mikroorganismů, jejich upevnění a tvorbu biofilmu. Na kolonizaci a tvorbě biofilmu se nejvíce podílí kvasinky rodu *Candida*. Po dozrání biofilmu na IUD dojde k uvolňování těchto mikroorganismů, což vede k chronické infekci. Vzniklá infekce se jen velmi těžko léčí, aniž by došlo k odstranění nitroděložního tělíska (Pruth *et al.* 2003).

5.5 Kloubní protézy

V moderní medicíně jsou nejčastějšími implantáty z kloubních protéz, kyčelní a kolenní protézy. Hlavními producenty biofilmu jsou kvasinky *C. albicans*, *C. parapsilosis* a *C. glabrata* (Ramage *et al.* 2006). Kontaminace protéz nastává s největší pravděpodobností během implantace. Implantace kolenních nebo kyčelních protéz s sebou nese vyšší riziko infekce v důsledku delšího trvání operací, s nízkým krevním průtokem do kortikální kosti a vytvoření hematomu ve větším mrtvém prostoru kolem protéz (obr. 4). Tyto hematomy mohou poškozovat okolní tkáně a zabránit vstupu antibiotik. Úmrtnost na infekci kloubních protéz je nízká. Úmrtnost v důsledku infekce kandid z kloubních protéz není známa (Kojic *and* Darouiche, 2004).

Rizikovými faktory pro infekci kloubních protéz jsou předchozí operace v místě protézy, revmatoidní artritidy, narušení imunity, diabetes mellitus, špatná životospráva, obezita, lupénka a pokročilý věk. Mezi první příznaky vzniku infekce je bolest, zarudnutí kůže, otoky, poruchy hojení ran, horečka, malátnost a zimnice. Pozdní projevy začínají přetrvávající bolestí, spojené s horečkou nebo bez ní. Rentgenové snímky zaznamenávají výpotek, v některých případech vykloubení kloubu, nesrovnalosti v kloubu a proražení léze v metafýze. Diagnóza je založena na izolaci organismu z nasáté kloubní tekutiny nebo kosti (Cuéllar *et al.* 1992).

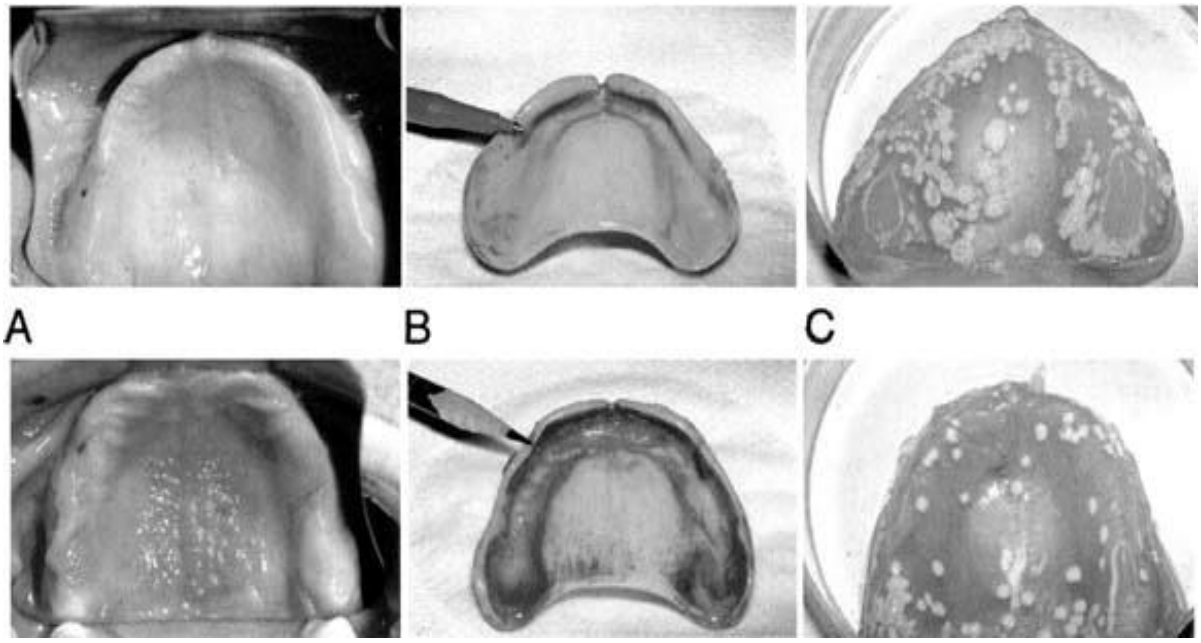
Léčba proti infekci je zahájena podáním antibiotik, pokud infekce přetrvává, dochází k odstranění protézy. Odstranění protézy je spojeno s velkými defekty skeletu, zkrácením končetiny a závažným poškozením funkce kosti. Předcházení infekcí obvykle zahrnuje chirurgické postupy, jako je důkladné odstranění neživé a nekrotické tkáně (Kojic *and* Darouiche, 2004).



Obrázek 4: a) zobrazení úplného odstranění náhrady kolenního kloubu po zaznamenané plísňové infekci b) zavedení nové kloubní náhrady (upraveno dle Reddy *et al.* 2013).

5.6 Zubní protézy

Kvasinkové buňky mají schopnost kolonizovat ústní povrchy, včetně sliznic, akrylových protéz a mají schopnost spolupracovat s agregáty ústních bakterií (obr. 5). Kvasinky rodu *Candida* souvisejí se stomatitidou. Onemocnění je multifaktoriální. Faktory, spojené s vývojem stomatitidy na protézách jsou kvalita chrupu, věk chrupu, čistota chrupu, trvalé nošení protéz, tvorba slin, kouření, pH plaku zubní protézy, věk a zdravotní stav jedince. Stomatitidy vzniklé po nošení zubních protéz se vyznačují zanícením sliznice, zejména u horních zubních protéz, pacienti mohou pociťovat pálení, nepohodlí, nebo špatný zkus. Ale ve většině případů pociťují problémy v dutině ústní, kde mikroorganismy kolonizují sliznici a vytvářejí biofilm (Ramage *et al.* 2004).

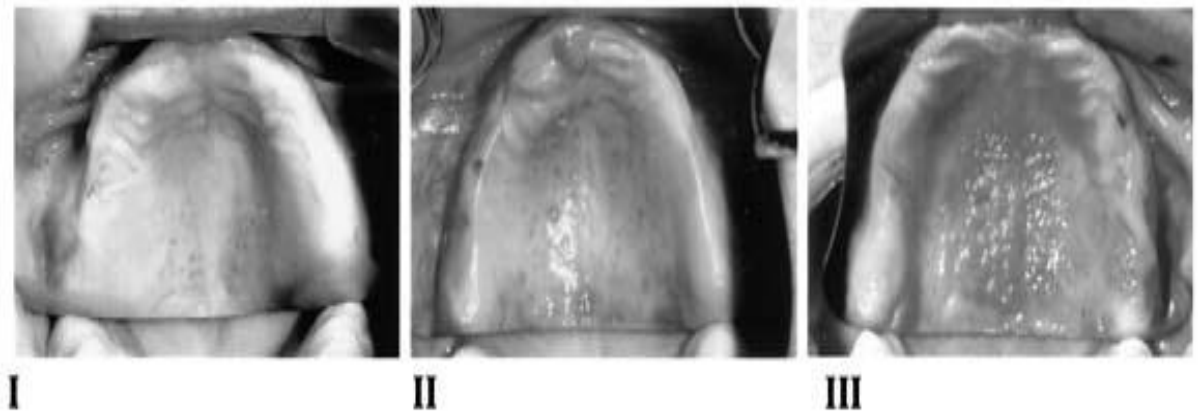


Obrázek 5: a) patro pacienta B) zubní protéza C) vyrostlé kvasinkové kolonie na zubní protéze. Horní řádek zobrazuje fotografie zdravého jedince a dolní řádek zobrazuje pacienta s třetím typem Newtony stomatitidy (upraveno dle Barbeau *et al.* 2003).

Obecně platí, že kvasinkové buňky mají vysoký potenciál kolonizovat umělé materiály téměř stejným způsobem, jako ústní tkáně. Povrchové vlastnosti materiálů, jako je drsnost povrchu, povrchová volná energie a chemické vlastnosti výrazně ovlivňují množství a kvalitu houbové adheze. Tyto biofilmy se skládají zejména ze složitých sítí kvasinkových buněk a hyf, které pronikají hluboko do trhlin. Zvýšená drsnost povrchu a praskliny mají za následek pevnější a rychlejší tvorbu biofilmu, oproti hladkému materiálu. Biofilmy pak lépe odolávají i omývání protézy (Bürgers *et al*. 2010).

Vytvořený biofilm má za následek vznik orofaryngeální kandidózy. Jedná se běžnou infekci u pacientů se sníženou imunitou a u starších osob, což má za následek bolesti a pálení v ústech a změnu chuti. Existuje řada klinických projevů orofaryngeální kandidózy, včetně pseudomembranózní kandidózy (moučnivka) a erytematózní formy (Coco *et al.* 2008).

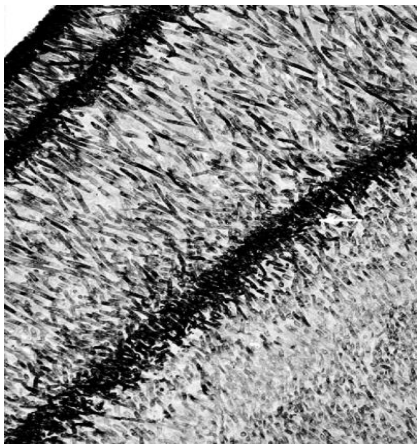
Newton charakterizoval stomatitidu do tří typů (obr. 6). Newton typ I charakterizuje stomatitidu jako lokalizované zarudnutí, Newton typ II je prezentován jako difúzní erytém a Newton typ III poukazuje na těžký erytém. Pacienti, u kterých nebyla prokázána stomatitida, měli růžově zdravou sliznici (Coco *et al.* 2008).



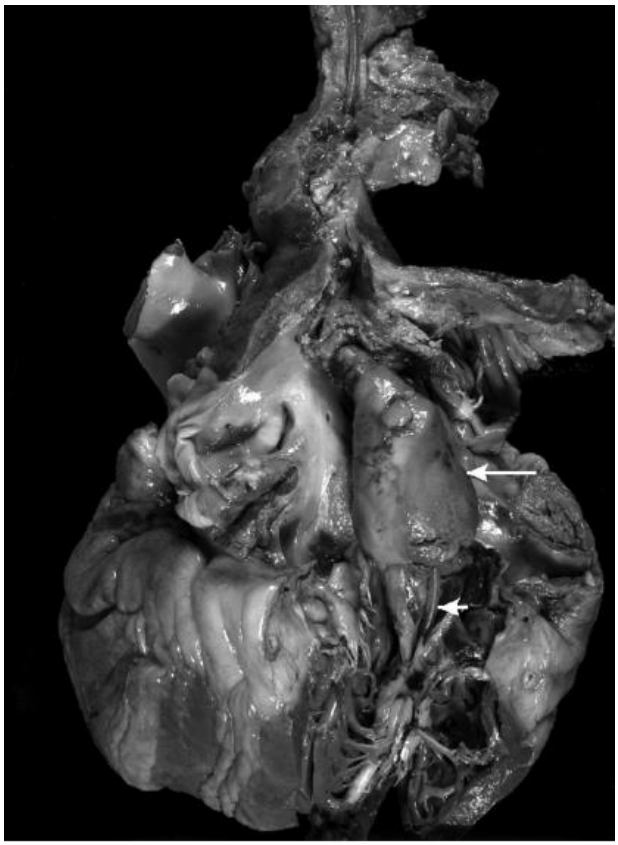
Obrázek 6: Tři typy stomatitid podle Newtona (upraveno dle Barbeau *et al.* 2003).

5.7 Kardiostimulátory

Implantace trvalého transvenózního kardiostimulátoru se používá k léčbě poruchy srdečního rytmu a arytmie. Plísňová endokarditida je vzácné onemocnění, které vzniká po implantaci kardiostimulátoru a je spojena s vysokou úmrtností. Přežití je do značné míry závislé na včasné diagnóze a léčbě. Nicméně, pozdní diagnóza je běžná vzhledem k četnosti nespecifických klinických příznaků. Vysoký index podezření na plísňovou endokarditidu by měl být spojován u jedinců s implantovaným kardiostimulátorem, ve spojení s vysokou horečkou, která nemá jistý zdroj vzniku a to zejména u jedinců, kteří mají krevní testy v pořádku. Plísňovou endokarditidu má za následek nejčastěji *Aspergillus fumigatus*. *Aspergillus fumigatus* tvoří odolné biofilmy na vedení kardiostimolátoru za vzniku infekce v trombu. Sama lékařská péče je zřídka kdy úspěšná, proto několik studií navrhlo rychlé odstranění infikovaných kardiostimulátorů (Leong *et al*. 2006; Kim *et al.* 2002).



Obrázek 7: Houbové hyfy plísně *Aspergillus*, která roste na kardiostimulátoru (zvětšení 200x; upraveno dle Leong *et al.* 2006).



Obrázek 8: Dlouhá šipka poukazuje na vzniklý trombus kolem vedení kardiostimulátoru (krátká šipka), které vystupuje z pravé komory do horní duté žíly (upraveno dle Leong *et al.* 2006).

6 Vliv biofilmu ve vodních systémech

Jednou z největších obav pro uživatele, pokud jde o kvalitu pitné vody, je kontaminace patogenními mikroorganismy. Některé mikroorganismy patří mezi známé kontaminanty vod. Mikroorganismy ve zvýšené koncentraci ve vodě způsobují u člověka onemocnění až epidemie. Kromě toho výsledky studií potvrzují, že především přítomné plísně znehodnocují senzorické vlastnosti pitné vody. Mezi ně patří chuť a vůně pitné vody. Ale také jejich přítomnost má za následek technologické a provozní poškození přístrojů. Studie autorů Hageskal *et al*. (2009) se zabývala testováním kvality vody. Přítomnost plísní byla prokázána ve všech typech vod, od silně znečištěné vody, užitkové vody, vyčištěné vody, destilované nebo ultra čisté vody. Plísně se dokonce vyskytovaly i v balené pitné vodě. Vyšší výskyt plísní je ve studené vodě než v teplé.

Plísně rostou ve vodních systémech, kde jsou tzv. „mrtvé“ prostory a v částech potrubí, kde je malý proud vody. Kromě toho, materiály, které tvoří nádrže a podložky přispívají k tvorbě biofilmů (Arvanitidou *et al.* 1999). Biofilmy vytvořené ve vodě představují zdroj patogenů pro pacienty i ošetřovatele. Všechny vhodné povrchy, které přijdou do styku s kontaminovanou vodou, slouží jako plocha k přichycení mikroorganismů a k tvorbě nového biofilmu. Mezi vhodné povrchy patří ty, co obsahují praskliny nebo jsou nerovnoměrné. Vytvořené biofilmy jsou obvykle tenké a nerovnoměrné. Je to z důvodu neustálého proudění vody a odplavovaní živin. Prudký proud vody, vysoká teplota nebo silné dezinfekční prostředky mají vliv na růst biofilmu (Wingender *and* Flemming, 2011).

Nemocniční instalační systémy a vodovodní sítě vytvářejí nádrž plísní a kvasinek s patogenními vlastnostmi. Biofilmy jsou tak považovány za dočasné nebo dlouhodobé zdroje patogenů, jejichž existence v biofilmu může dokonce představovat součást jejich přirozeného životního cyklu. Mikroorganismy v biofilmu jsou více rezistentní k dezinfekčním prostředkům, používaných v praxi pro úpravu vody. Mikroorganismy uvolněné z biofilmů procházejí nejčastěji dál do vodovodního systému, díky neefektivní filtrační bariéře (Wingender *and* Flemming, 2011). Biofilmy obsahují i spory plísní, které se volně vyskytují na jeho povrchu. I když biofilm tvoří různé druhy mikroorganismů, bylo prokázáno, že ve vodním systému je větší přítomnost biofilmu, který vytvořily plísně než jiné druhy mirkoorganismů (Doggett, 2000).

V důsledku výroby organických kyselin v metabolických procesech, se zrychluje mikrobiologická koroze vodovodního potrubí. Dezinfekce vody je narušena v důsledku obtíží

při udržování účinné koncentrace chloru. Plísně produkují i ve vodě mykotoxiny. Mykotoxiny, produkované v tekoucí vodě, jsou velmi ředěné. Nicméně, voda je občas zadržena v cisternách a nádržích nebo dokonce v lahvích, na delší dobu. V takovém případě se koncentrace mykotoxinů může zvýšit. Vyšší příjem mykotoxinů má nebezpečný vliv na zdravotní stav jedince (Nagy *and* Olson, 1982).

Aspergillus fumigatus je jedním z nejvýznamnějších houbových patogenů způsobující infekce u pacientů se sníženou obranyschopností v nemocnicích a míra infekce se u těchto pacientů zvyšuje. Vzhledem k rostoucímu počtu těžce imunokompromitovaných pacientů, se nemocnice musí potýkat s vyšším výskytem infekcí. Existuje hypotéza, že houby ve vodě přecházejí do vzduchu, když voda prochází zařízením, jako jsou kohoutky a sprchy. Ve vzduchu byly nalezeny především spory plísní rodu *Fusarium* a *Aspergillus*. Při vdechování spor plísní v nemocničním prostředí dochází u pacientů k průniku přes odřené sliznice v ústní dutině, v kůži a v rohovce, nebo přímo do krve a vnitřních orgánů zvláště v případě u pacientů s vloženým katétrem (Hageskal *et al*. 2009). Kvasinky rodu *Candida* se ukázaly jako čtvrtý nejčastější patogen u infekce krevního řečiště v nemocnici s více než 55 % úmrtnosti (Arvanitidou *et al.* 1999).

7 Vliv biofilmu v potravinářském průmyslu

Biofilmy přináší řadu problémů v potravinářském průmyslu od zpracování mořských plodů, zpracování mléka a mléčných výrobků, zpracování drůbeže, v pivovarnictví a při zpracování masa až po přípravu kulinářských pokrmů. Tvorba biofilmu v mlékárenském průmyslu je významným problémem. Běžná kontaminace mléka, mléčných výrobků je spojena s biofilmy. Kontaminace mléka a mléčných výrobků biofilmy je způsobena nesprávným čištěním a dezinfekcí zařízení (Simões *et al*. 2010).

Tvorba biofilmu může ohrozit sanitaci potravinářských povrchů. Přítomnost biofilmů lze rozdělit podle jejich výskytu v jednotlivých úsecích závodu. Biofilmy se tvoří v průmyslech na podlaze, skladovacích nádržích, ručních vozících, dopravníkových pásech, různých plastech, sklech, dřevech a dalších materiálech, které přicházejí do styku s potravinami včetně potravinářských výrobků. Výsledky potvrdily, že biofilmy vytvořené v potravinářském průmyslu tvoří především patogenní mikroorganismy (Shi *et al*. 2009). Přilnavost biofilmu k povrchu je také závislá na fyzikálně chemických vlastnostech povrchu, jako jsou textury (hrubý nebo hladký povrch), povrchový náboj, pH , teplota a obsah živin (Srey *et al*. 2013).

Biofilmy jsou odolnější vůči namáhání nebo mikrobiální inaktivaci včetně některých metod používaných v konzervování potravin. V potravinářském průmyslu biofilmy odolávají dehydrataci, nízké teplotě a antimikrobiálním činidlům (Trachoo, 2003).

Pokud vytvořené biofilmy z patogenních mikroorganismů přijdou do styku s potravinami, mohou způsobit hygienické problémy. Hlavně proto, že patogenní biofilmy poskytují rezervoár kontaminace. Vytvořený biofilm chrání patogeny, čímž je ohroženo zpracování potravin. Kromě toho mikrobiální biofilmy na površích mohou vést k poškození zařízení, kontaminaci produktu a ztrátám energie. Přítomnost biofilmu na potravinách nebo na výrobní ploše má často nepříznivý vliv na bezpečnost potravin, a to zejména u potravin, které jsou minimálně zpracované nebo u syrových potravin (Trachoo, 2003).

Nemoci přenášené potravou pokrývají širokou škálu onemocnění. Světová zdravotnická organizace (WHO) uvedla, že kontaminace potravin se může vyskytnout v jakékoliv fázi procesu od výroby potravin po spotřebu a může mít za následek i kontaminaci v oblasti životního prostředí, včetně znečištění vod, půdy nebo vzduchu (Srey *et al*. 2013).

Podle Světové zdravotnické organizace nemoci způsobené patogeny jsou považovány za naléhavý problém veřejného zdraví v zemích rozvinutých i rozvojových (WHO, 2007; Srey *et al*. 2013).

8 Zabránění tvorbě biofilmu a jeho odstranění

Čas potřebný pro tvorbu biofilmu závisí na frekvenci čištění a dezinfekci. Zařízení v potravinářském průmyslu jsou čištěny několikrát za den, zatímco povrchy stěn mohou být čištěny pouze jednou za den. Z tohoto důvodu je více času pro tvorbu biofilmu na povrchu stěn a dochází k rozsáhlé povrchové kolonizaci (Meyer, 2003). Nežádoucí biofilmy se vytvářejí rychle na povrchu, který je pokryt kontaminujícími zbytky, jako jsou sacharidy, tuky, bílkoviny, minerální soli a mikroorganismy, které mají být odstraněny z povrchu. Kromě toho výběr čistících a dezinfekčních prostředků závisí na jejich účinnosti, bezpečnosti a manipulaci, zejména u protikorozního druhu chemického ošetření. Zařízení, konstrukce a výběr povrchových materiálů jsou důležité v prevenci proti tvorbě biofilmu. Nejpraktičtější materiály používané v průmyslu jsou z oceli, které mohou být ošetřeny mechanickým broušením, kartáčováním a elektrolytickým nebo mechanickým leštěním. Rohy, praskliny, trhliny, těsnění, ventily a spoje jsou vhodné plochy pro osídlení biofilmy. Pokud existují konstrukční závady na zařízení, hygiena nemůže být nikdy zcela efektivní. Za předpokladu, že zařízení je bez vady, efektivní čištění a dezinfekce jsou hlavní strategií pro zabránění tvorby biofilmu, protože je odstraněn nežádoucí materiál z povrchu, včetně mikroorganismů. Použitím vysoké teploty se snižuje potřeba aplikace fyzických sil, jako je drhnutí. Chemické výrobky běžně používané pro čištění jsou povrchově aktivní látky nebo alkalické produkty používané k urychlení rozpuštění zbytků potravin. Dezinfekční prostředky však neproniknou dovnitř biofilmu, a tudíž nezničí všechny živé buňky v biofilmu (Simões *et al.* 2010).

Prvním opatřením proti tvorbě biofilmu v lékařství je zabránění kontaminace zařízení před jeho zavedením do těla pacienta. Proto je důležité udržet optimální aseptické podmínky. Za druhé jsou přijata opatření k minimalizaci počáteční kolonizace buněk na povrchu zařízení. Například, použití antimikrobiálního povlaku na zařízení. Za třetí pokud dojde k utvoření biofilmu, je nutno použít prostředky, které mají schopnost proniknout do matrixu biofilmu a zabít přítomné mikroorganismy, jako se například používá vysoká dávka antibiotik nebo etanolu. Konečnou možností je odstranění infikovaného zařízení (Aslam, 2008).

Začleněním antimikrobiálních přípravků do povrchových materiálů bylo prokázáno snížení infekce. Pomocí silikonové pryže se na implantáty kovalentně vážou kvartérní amoniové povlaky. Kvasinky rodu *Candida* jsou obecně zodpovědné za zhoršení silikonové pryže u hlasivkových protéz, protože kvasinky prorůstají dovnitř do pryže. Preventivní opatření byla zaměřena především proti biofilmům utvořenými kvasinkami. Pacientům byla

podávána antimykotika. Kromě toho nebyl prokázán přesvědčivý důkaz o tom, že aplikace protiplísňových prostředků prodlužuje životnost hlasivkových protéz (Elving *et al.* 2001).

Další testy prokázali snížení tvorby biofilmu u materiálů potažených na povrchu stříbrem. Stříbro se ukázalo být hodnotnou alternativou, bez nežádoucích účinků. Stříbro je vysoce aktivní sloučenina, která působí proti širokému spektru mikroorganismů, které kolonizují plastové povrchy. Stříbro je dobře snášeno organismem a vykazuje mimořádně nízký profil toxicity s výbornou tolerancí ke tkáním. Katetry impregnované stříbrem se běžně používají ve zdravotnictví a vykazují dobré výsledky. Stříbrné ionty tvoří nerozpustné sloučeniny se sulfohydrylovou skupinou v buněčné stěně mikroorganismů, která jsou základní součástí enzymů odpovědných za metabolismus a transport elektrolytů. Ionty stříbra blokují dýchací řetězec mikroorganismů. Bylo zjištěno, že povrchy impregnované nanočásticemi stříbra vykazují hydrofilní vlastnosti na povrchu a to pomáhá při prevenci proti přilnutí mikroorganismů k povrchu materiálu a následnému vytvoření biofilmu mikroorganismy. Pro optimální ochranu musí být katetry potaženy na vnějším a vnitřním povrchu (Samuel *and* Guggenbichler, 2004).

Použití povrchově aktivních látek získaných z probiotických bakterií představují perspektivní strategii, aby se zabránilo mikrobiální kolonizaci silikonového kaučuku u hlasivkových protéz, a tím se prodlužuje jejich životnost. Některé kmeny jsou schopné uvolnit povrchově aktivní látky, zatímco jiné jsou známé svými antimykotickými účinky, například produkují kyselinu mléčnou, nebo peroxid vodíku. Povrchově aktivní látky jsou mikrobiální polymery, které mají tendenci k interakci s rozhraním fází mezi dvěma fázemi v heterogenním systému. Jedná se o rozhraní, které interferuje s mikrobiální adhezí. Povrchově aktivní látky mohou být orientovány různými způsoby. Povrchově aktivní látky se staly důležitým biotechnologickým produktem pro průmyslové a lékařské metody. Jejich popularita jako vysoce hodnotný mikrobiální produkt souvisí s jejich nízkou toxicitou a relativní snadností v jejich přípravě. Mohou být použity jako emulgátory, smáčedla, činidla, pěnotvorné látky, funkční složky potravin a detergenty v různých průmyslových sektorech. Povrchově aktivní látky se v lékařství používají jako anti- lepidlo na povrch katetru. Bylo prokázáno, že probiotické bakterie mají bioterapeutický potenciál pro profylaxi a terapii proti kandidóze (Rodrigues *et al.* 2007).

Některá chelatační činidla, jako je kyselina ethylen-diaminetetraoctavá (EDTA), mohou mít také antimikrobiální vlastnosti proti bakteriím a houbám. EDTA se používá

současně v kombinaci s minocyklinem proti bakteriálním a houbovým biofilmům (Donlan, 2011).

Dalším hydrofilním polymerem je kyselina hyaluronová, která se používá u močových katétrů. Bylo prokázáno, že úspěšně sníží adhezi. Kyselina hyaluronová je také používána pro její schopnost nejen snížit mikrobiální adhezi, ale také za její sklon k příjmu a uvolnění antibiotik. V lékařství lze využít i heparinové povlaky. Heparinové povlaky zabraňují mikrobiální adhezi a kolonizaci in vitro a in vivo. Heparin snižuje depozici fibronektinu na povrchu cévních katétrů a katétr je pak negativně nabitý, čímž se zabrání trombóze a dojde ke snížení mikrobiální kolonizace. Další výzkum navrhl jako prevenci u infekce močových cest, impregnovat katetry různými druhy antibiotik, jako jsou například nitrofurazon, gentamicin, norfloxacin a minocyklin-rifampicin. V současné době se na trhu používají močové katétry potažené nitrofurazonem, které jsou ze silikonového materiálu (Francolini *and* Donelli, 2010).

Chlorhexidin účinně snižoval životaschopnost biofilmu, když byl aplikován na povrch materiálu před kolonizací mikroorganismů a jejich následnému vytvoření biofilmu. Chlorhexidin je jedním z nejvíce testovaných sloučenin a jeho anti-povrchové vlastnosti jsou dobře známé. Při vysokých koncentracích má mikrobicidní účinky. Poškozuje buněčné membrány mikroorganismů. V poslední době byla vyvinuta metoda, kdy se chlorhexidin nanese přímo na zuby. Antimikrobiální účinky byly prokázány jak in vitro, tak i in vivo. Dlouhodobé užívání chemických látek podporuje výběr látek s jinými vlastnostmi než mikrobicidními nebo mikrobistatickými. Zároveň je, ale i potřeba, aby dané látky účinně zabránily přilnutí mikroorganismů a jejich kolonizaci povrchu. Tím by se zachovalo biologické prostředí dutiny ústní. Budoucí testy biofilmu v laboratoři se mohou ukázat jako užitečné nástroje pro studium mechanismů působení chemických látek na molekulární úrovni (Baehni *and* Takeuchi, 2003).

Infekce krevního řečiště nastává u imunosuprimovaných pacientů, kteří mají zavedené intravaskulární katetry. Proto došlo k zavedení 70% etanolu do uzávěru katetru. Donlan (2011) ve své studii prokázal, že došlo k vymýcení buněk 20% etanolem, které tvořily biofilm za 24 hodin. Za 1 hodinu byly buňky odstraněny 40% etanolem a 60% - 80% etanol úplně odstranil buňky biofilmu za 1 minutu. Etanol má hydrofilní povahu a malou molekulovou hmotnost, což umožňuje efektivní průnik extracelulárním matrixem biofilmu.

9 Závěr

Ve své práci jsem pomocí studia a komparace odborných článku došla k závěru, že dnešní moderní medicínu si bez zavedení umělých materiálů do těla člověka snad ani nedovedeme představit. Zavedením umělých materiálů do těla člověka dochází k vytvoření biofilmu na povrchu těchto materiálů a ke vzniku infekce. Vytvořený biofilm zařízení znehodnocuje a způsobuje poškození jeho funkce. Struktura a složení materiálu povrchu má vliv na tvorbu biofilmu. Hrubé povrchy s rýhami poskytují dobré prostředí pro zachycení mikroorganismů a následnou tvorbu biofilmu. Nejčastěji biofilmy v lidském těle tvoří kvasinky rodu *Candida*. Vzniklé infekce pak způsobují další zdravotní problémy, které ohrožují zdravotní stav člověka.

Ve zdravotnictví je nejdůležitější zabránit vytvoření biofilmu na materiálu před jeho zavedením do těla člověka. Lidské tělo představuje velmi vhodné prostředí pro růst a rozmnožování mikroorganismů, proto se ve zdravotnictví dodržují přísné aseptické podmínky. Pokud dojde k vytvoření biofilmu, používají se silná antibiotika, které jsou schopny proniknout přes vytvořený biofilm k buňkám, které ho tvoří. Bohužel ne vždy jsou antibiotika natolik účinná. Biofilmy jsou schopné odolávat i imunitnímu systému člověka. Z tohoto důvodu je někdy odstranění zařízení z těla člověka jedinou možností. To sebou nese ovšem velké riziko, které má vliv na zdravotní stav člověka.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Centrální stromální infiltrace a okolní zánětlivý prsten s hypopyonem (Alfonso *et al.* 2006). 27

Obrázek 2: Biofilm tvořený kvasinkami rodu *Candida* na stěně katetru značeného pomocí fluorescenčních barviv. A) vizualizace červené a zelené fluorescence B) vizualizace červené fluorescence. Červené fluoreskující kvasinky jsou metabolicky aktivní (upraveno dle Andes *et al*. 2004). 28

Obrázek 3: Biofilm na katetru, který je zavedený do močového měchýře. A) průřez katetru močového měchýře s přetrvávající kandidurii B) masa hyf *C. albicans* v močovém katetru (upraveno dle Fisher *et al.* 2011). 30

Obrázek 4: a) zobrazení úplného odstranění náhrady kolenního kloubu po zaznamenané plísňové infekci b) zavedení nové kloubní náhrady (upraveno dle Reddy *et al.* 2013). 32

Obrázek 5: a) patro pacienta B) zubní protéza C) vyrostlé kvasinkové kolonie na zubní protéze. Horní řádek zobrazuje fotografie zdravého jedince a dolní řádek zobrazuje pacienta s třetím typem Newtony stomatitidy (upraveno dle Barbeau *et al.* 2003). 33

Obrázek 6: Tři typy stomatitid podle Newtona (upraveno dle Barbeau *et al.* 2003). 34

Obrázek 7: Houbové hyfy plísně *Aspergillus*, která roste na kardiostimulátoru (zvětšení 200x; upraveno dle Leong *et al.* 2006). 34

Obrázek 8: Dlouhá šipka poukazuje na vzniklý trombus kolem vedení kardiostimulátoru (krátká šipka), které vystupuje z pravé komory do horní duté žíly (upraveno dle Leong *et al.* 2006). 35

ZDROJE

- ALFONSO, E. C., et al. Insurgence of *Fusarium* keratitis associated with contact lens wear. *Archives of ophthalmology*. 2006, 124 (7): 941-947.

- AMADIO, J., E. CASEY a C. D. MURPHY. Filamentous fungal biofilm for production of human drug metabolites. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, 97 (13): 5955-5963.

- ANDES, D., J. NETT, P. OSCHEL, R. ALBRECHT, K. MARCHILLO a A. PITULA. Development and Characterization of an In Vivo Central Venous Catheter *Candida albicans* Biofilm Model. *Infection and Immunity*. 2004, 72 (10): 6023-6031.

- ARVANITIDOU, M., K. KANELLOU, T. C. CONSTANTINIDES a V. KATSOUYANNOPOULOS. The occurrence of fungi in hospital and community potable waters. *Letters in Applied Microbiology*. 1999, 29 (2): 81-84.

- ASLAM, S. Effect of antibacterials on biofilms. *American journal of infection control*. 2008, 36 (10): s175. e9-e11.

- BAEHNI, P. C. a Y., TAKEUCHI. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral diseases*. 2003, 9 (1): 23-29.

- BARBEAU, J., J. SÉGUIN, J. P. GOULET, L. DE KONINCK, S. L. AVON, B. LALONDE, P. ROMPRÉ a N. DESLAURIERS. Reassessing the presence of Candida albicans in denture-related stomatitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2003, 95 (1): 51-59.

- BÜRGERS, R., S. HAHNEL, T. E. REICHERT, M. ROSENTRITT, M. BEHR, T. GERLACH, G. HANDEL a M. GOSAU. Adhesion of *Candida albicans* to various dental

implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomaterialia*. 2010, 6 (6): 2307-2313.

- CARTER, G. R. a J. R. COLE, Jr. *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology*. 5th ed. San Diego, California.: Academic Press, 1990, 620 s. ISBN 01-216-1775-0.

- COCO, B. J., J. BAGG, L. J. CROSS, A. JOSE, J. CROSS a G. RAMAGE. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiology and Immunology*. 2008, 23 (5): 377-383.

- CUÉLLAR, M. L., L. H. SILVEIRA a L. R. ESPINOZA. Fungal arthritis. *Annals of the rheumatic diseases.* 1992, 51 (5): 690–697.

- DOGGETT, M. S. Characterization of Fungal Biofilms within a Municipal Water Distribution System. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, 66 (3): 1249-1251.

- DONLAN, R. M. a J. W. COSTERTON. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002, 15 (2): 167-193.

- DONLAN, R. M. Biofilm elimination on intravascular catheters: important considerations for the infectious disease practitioner. *Clinical infectious diseases*. 2011, 52 (8): 1038-1045.

- DOUGLAS, L. J., E. CASEY a C. D. MURPHY. Candida biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*. 2003, 11 (1): 30-36.

- ELLIS, D. et al. *Descriptions of medical fungi: Women's and Children's Hospital*. 2nd ed. Adelaide, Australia, 2007, 198 s. ISBN 9780959851267.

- ELVING, G. J., H. C. VAN DER MEI, H. J. BUSSCHER, R. VAN WEISSENBRUCH a F. W. J. ALBERS. Air-flow resistances of silicone rubber voice prostheses after formation of bacterial and fungal biofilms. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001, 58 (4): 421-426.

- FISHER, J. F., K. KAVANAGH, J. D. SOBEL, C. A. KAUFFMAN a C. A. NEWMAN. *Candida* Urinary Tract Infection: Pathogenesis. *Clinical Infectious Diseases*. 2011, 52 (6): 437-451.

- FLEMMING, H-C., J. WINGENDER a C. D. MURPHY. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 2010, 8 (9): 623-633.

- FRANCOLINI, I. a G. DONELLI. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2010, 59 (3): 227-238.

- GUPTA, M., K. MANISHA a R. GROVER. Effect of various media types on the rate of growth of *Aspergillus niger*. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*. 2012, 2 (2): 141-144.

- GUTIÉRREZ-CORREA, M., Y. LUDEÑA, G. RAMAGE a G. K. VILLENA. Recent Advances on Filamentous Fungal Biofilms for Industrial Uses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012, 167 (5): 1235-1253.

- HAAS, L. O., J. M. CREGG a M. A. GLEESON. Development of an integrative DNA transformation system for the yeast *Candida tropicalis*. *Journal of bacteriology*. 1990, 172 (8): 4571-4577.

- HAGESKAL, G., N. LIMA a I. SKAAR. The study of fungi in drinking water. *Mycological Research*. 2009, 113 (2): 165-172.

- HACHEM, R., R. REITZEL, A. BORNE, Y. JIANG, P. TINKEY, R. UTHAMANTHIL, J. CHANDRA, M. GHANNOUM a I. RAAD. Novel Antiseptic Urinary Catheters for Prevention of Urinary Tract Infections: Correlation of In Vivo and In Vitro Test Results. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009, 53 (12): 5145-5149.

- HITCHCOCK, C. A., G. W. PYE, P. F. TROKE, E. M. JOHNSON a D. W. WARNOCK. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993, 37 (9): 1962-1965.

- HOGAN, D. A. Talking to Themselves: Autoregulation and Quorum Sensing in Fungi. *Eukaryotic Cell*. 2006, 5 (4): 613-619.

- HUANG, B., M. BATES a X. ZHUANG. Super resolution fluorescence microscopy. *Annual review of Biochemistry*. 2009, 78: 993.

- CHANDRA, J., D. M. KUHN, P. K. MUKHERJEE, L. L. HOYER, T. MCCORMICK a M. A. GHANNOUM. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of Bacteriology*. 2001, 183 (18): 5385-5394.

- IMAMURA, Y., J. CHANDRA, P. K. MUKHERJEE, A. A. LATTIF, L. B. SZCZOTKA-FLYNN, E. PEARLMAN, J. H. LASS, K. O'DONNELL a M. A. GHANNOUM. *Fusarium* and *Candida albicans* Biofilms on Soft Contact Lenses: Model Development, Influence of Lens Type, and Susceptibility to Lens Care Solutions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007, 52 (1): 171-182.

- KIM, H-Y., et al. *Aspergillus* infection in a large thrombus of a permanent ventricular pacing lead. *Journal of Korean medical science*. 2002, 17 (5): 691.

- KOJIC, E. M. a R. O. DAROUICHE. *Candida* Infections of Medical Devices. *Clinical Microbiology Reviews*. 2004, 17 (2): 255-267.

- LATGÉ, J-P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*. 1999, 12 (2): 310-350.

- LEONG, R., B. R. GANNON, T. J. CHLIDS, P. A. ISOTALO a H. ABDOLLAH. *Aspergillus fumigatus* pacemaker lead endocarditis: a case report and review of the literature. *Canadian Journal of Cardiology*. 2006, 22 (4): 337-340.

- LI, X., Z. YAN a J. XU. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*. 2003, 149 (2): 353-362.

- McAULIFFE, L., R. J. ELLIS, J. R. LAWES, R. D. AYLING a R. A. NICHOLAS. 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *Journal of Medical Microbiology*. 2005, 54 (8): 731-739.

- MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2003, 51 (4): 249-253.

- MICHLER, G. H. *Electron Microscopy of Polymers*. Berlin: Springer, 2008, 473 s. ISBN 978-3-540-36350-7.

- MÖHLENHOFF, P., L. MÜLLER, A. A GORBUSHINA, K. PETERSEN, T. MCCORMICK a M. A. GHANNOUM. Molecular approach to the characterisation of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects. *FEMS Microbiology Letters*. 2001, 195 (2): 169-173.

- NAGY, L. A. a B. H. OLSON. The occurrence of filamentous fungi in drinking water distribution systems. *Canadian Journal of Microbiology*. 1982, 28 (6): 667-671.

- NELSON, P. E., M. C. DIGNANI a E. J. ANAISSIE. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 1994, 7 (4): 479.

- NIELSEN, H. and K. JOSEFSEN. *RNA: methods and protocols*. New York: Humana Press, 2011, 329 s. ISBN 978-1-59745-248-9.

- PAL, Z. Biofilm formation on intrauterine devices in relation to duration of use. *Journal of Medical Microbiology*. 2005, 54 (12): 1199-1203.

- PFALLER, M. A., A. HOUSTON a S. COFFMANN. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Journal of clinical mikrobiology*. 1996, 34 (1): 58-61.

- PRUTH, V., A. AL-JANABI a B. J. PEREIRA. Characterization of biofilm formed on intrauterine devices. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2003, 21 (3): 161-165.

- RAMAGE, G., J. P. MARTÍNEZ a J. L. LÓPEZ-RIBOT. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Research*. 2006, 6 (7): 979-986.

- RAMAGE, G., K. TOMSETT, B. L. WICKES, J. L. LÓPEZ-RIBOT a S. W. REDDING. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2004, 98 (1): 53-59.

- RAMAGE, G., R. RAJENDRAN, L. SHERRY a C. WILLIAMS. Fungal Biofilm Resistance. *International Journal of Microbiology*. 2012, 2012 (2): 1-14.

- RAMAGE, G., R. RAJENDRAN, M. GUTIERREZ-CORREA, B. JONES a C. WILLIAMS. *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. *FEMS Microbiology Letters*. 2011, 324 (2): 89-97.

- RAMAGE, G., S. P. SAVILLE, B. L. WICKES, J. L. LOPEZ-RIBOT, T. MCCORMICK a M. A. GHANNOUM. Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, 68 (11): 5459-5463.

- RAPLEY R. and J. M. WALKER. *Molecular biomethods handbook*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1998. ISBN 978-159-2596-423.

- REDDY, K. J., J. D. SHAH, R. V. KALE, T. J. REDDY. Fungal prosthetic joint infection after total knee arthroplasty. *Indian journal of orthopaedics*, 2013, 47 (5): 526-529.

- RIBES, J. A., C. L. VANOVER-SAMS a D. J. BAKER. *Zygomycetes* in Human Disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000, 13 (2): 236-301.

- RODRIGUES, L., I. M. BANAT, J. TEIXEIRA, R. OLIVEIRA a F. W. J. ALBERS. Strategies for the prevention of microbial biofilm formation on silicone rubber voice prostheses. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2007, 81B (2): 358-370.

- ROSYPAL, S. a kol. *Úvod do molekulární biologie: Díl čtvrtý. Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství,*

genová terapie. 3. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, s. 904-1200. ISBN 80-902-5624-4.

- SAMUEL, U., J. P. GUGGENBICHLER. Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter. *International journal of antimicrobial agents*. 2004, 23 (1): 75-78.

- SHI, X. a X. ZHU. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*. 2009, 20 (9): 407-413.

- SILVESTRE jr, A. M., M. A. B. R. MIRANDA a Z. P. CAMARGO. *Trichosporon* species isolated from the perigenital region, urine and catheters of a Brazilian population. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010, 41 (3): 628-634.

- SIMÕES, M., L. C. SIMÕES a M. J. VIEIRA. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*. 2010, 43 (4): 573-583.

- SREY, S., I. K. JAHID a S-D. HA. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*. 2013, 31 (2): 572-585.

- SRIVASTAVA, S., N. PATHAK a P. SRIVASTAVA. Identification of limiting factors for the optimum growth of *Fusarium oxysporum* in liquid medium. *Toxicology international*. 2011, 18 (2): 111-116.

- SUDBERY, P., N. GOW a J. BERMAN. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. 2004, 12 (7): 317-324.

- TAJ-ALDEEN, S. J., N. AL-ANSARI, S. EL SHAFEI, J. F. MEIS, I. CURFS-BREUKER, B. THEELEN a T. BOEKHOUT. Molecular Identification and Susceptibility of *Trichosporon*

Species Isolated from Clinical Specimens in Qatar: Isolation of *Trichosporon* dohaense Taj-Aldeen, Meis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009, 47 (6): 1791-1799.

- TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. *Biofilms*. 2003, 25 (6): 808.

- VERSTREPEN, K. J. a F. M. KLIS. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology*. 2006, 60 (1): 5-15.

- VOTAVA, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902-8966-5.

- VOTAVA, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie: vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010, 495 s. ISBN 978-808-6850-047.

- WANG, Z-W., S. CHEN a C. D. MURPHY. Potential of biofilm-based biofuel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 83 (1):1-18.

- WINGENDER, J. a H-C FLEMMING. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2011, 214 (6): 417-423.