

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Petra Hodačová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Otitis media s perzistencí biofilmů

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Petra Hodačová**
Osobní číslo: **C21171**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Otitis media s perzistencí biofilmů**
Téma práce anglicky: **Otitis Media with Persistence of Biofilms**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši na zadané téma. V úvodu práce se věnujte sluchovému aparátu člověka se zaměřením na možná klinická onemocnění.
2. Zpracujte literární rešerši o *otitis media*, původcích tohoto onemocnění a také různých formách u dětí i dospělých pacientů.
3. Zhodnoťte riziko tvorby biofilmů u původců *otitis media*. Zaměřte se na klinické dopady a možnosti terapie.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směnicí č. 7/2019 Univerzity Pardubice "Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací".

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. David Šilha, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem ***Otitis media s perzistencí biofilmů*** 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 2. 5. 2024

Petra Hodačová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu své bakalářské práce doc. Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D. za jeho cenné rady, vstřícnost při konzultacích a věnovaný čas při vypracování této bakalářské práce. Dále děkuji své rodině a přátelům za podporu a pochopení po celou dobu studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou zánětlivého onemocnění *otitis media*, a to zejména v souvislosti s tvorbou biofilmů. Práce zahrnuje informace o struktuře biofilmu, jeho složení a o metodách detekce těchto struktur. Předmětem textu je dále zhodnocení významu tvorby biofilmů v souvislosti s rezistencí k antibiotikům. Součástí práce je i stručný pohled na anatomii sluchového aparátu a jsou zmíněny příčiny vzniku *otitis media*. Dále práce zahrnuje informace o hlavních původcích *otitis media* a také klinických formách tohoto onemocnění vč. možností terapie. Další součástí textu jsou vybrané diagnostické metody *otitis media*. Závěrem jsou popsány možnosti prevence vzniku *otitis media* a informace o typech vakcín zaměřených na potenciální původce infekce.

KLÍČOVÁ SLOVA

Biofilm; antibiotická rezistence; *otitis media*; recidiva; perzistence; terapie; diagnostika; prevence; vakcína

TITLE

Otitis media with persistence of biofilms

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the issue of inflammatory disease *otitis media*, especially in the context of biofilm formation. The thesis includes information on the structure of biofilms, their composition and methods of detection of these structures. The text also evaluates the importance of biofilm formation in the context of antibiotic resistance. A brief look at the anatomy of the auditory system is also included and the causes of *otitis media* are discussed. Furthermore, the thesis includes information on the main causative agents of *otitis media* as well as the clinical forms of the disease, including therapeutic options. Another part of the text includes selected diagnostic methods of *otitis media*. In conclusion, the possibilities of prevention of *otitis media* and information on types of vaccines targeting potential infectious agents are described.

KEYWORDS

Biofilm; antibiotic resistance; *otitis media*; recurrence; persistence; therapy; diagnosis; prevention; vaccine

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
ÚVOD	12
1. BAKTERIÁLNÍ BIOFILM	14
1.1. Struktura a složení biofilmu	15
1.2. Tvorba biofilmu	17
1.3. Detekce bakteriálního biofilmu	20
1.3.1. Molekulárně-biologické metody	20
1.3.2. Mikroskopické techniky	20
1.3.3. Kolorimetrické testy	22
1.4. Význam tvorby biofilmů v klinické praxi	23
1.4.1. Antibiotická rezistence	23
1.4.2. Nedostatečná imunitní odpověď hostitele	25
1.4.3. Vybraná onemocnění spojená s tvorbou biofilmu	26
2. OTITIS MEDIA	29
2.1. Anatomie a histologie sluchového aparátu	29
2.2. Příčiny vzniku <i>otitis media</i>	31
2.3. Původci <i>otitis media</i>	32
2.3.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	33
2.3.2. <i>Haemophilus influenzae</i>	35
2.3.3. <i>Moraxella catarrhalis</i>	38
2.4. Klinické formy <i>otitis media</i>	40
2.4.1. <i>Otitis media acuta</i>	41
2.4.2. <i>Otitis media chronica</i>	45
2.4.3. <i>Otitis media chronica suppurativa</i>	46
2.4.4. <i>Otitis media chronica suppurativa epitympanalis</i>	48

2.4.5.	Perzistující a recidivující <i>otitis media</i>	51
2.5.	Diagnostika <i>otitis media</i> a původců onemocnění	52
2.5.1.	Otoskopie	53
2.5.2.	Otomikroskopie	55
2.5.3.	Tympanometrie	56
2.5.4.	Pneumatická otoskopie	57
2.5.5.	Akustická reflektometrie.....	58
2.5.6.	Optická koherentní tomografie	58
4.	PREVENCE VZNIKU <i>OTITIS MEDIA</i>	60
4.1.1.	Pneumokokové polysacharidové vakcíny.....	61
4.1.2.	Pneumokokové konjugované vakcíny	62
4.1.3.	Vakcíny proti <i>Haemophilus influenzae</i> a <i>Moraxella catarrhalis</i>	62
5.	ZÁVĚR	64
	POUŽITÁ LITERATURA	66

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Ilustrace <i>quorum sensing</i>	16
Obrázek 2: Schéma tvorby biofilmu	17
Obrázek 3: Biofilm laterální strany nosní skořepy vizualizovaný konfokální skenovací laserovou mikroskopií.....	21
Obrázek 4: Kolonie <i>Staphylococcus epidermidis</i> na BHI agaru doplněném o konžskou červeň.....	22
Obrázek 5: Anatomie sluchového aparátu.....	30
Obrázek 6: Kolonie <i>Streptococcus pneumoniae</i> na krevním agaru	33
Obrázek 7: Kolonie <i>Haemophilus influenzae</i> na čokoládovém agaru	36
Obrázek 8: Kolonie <i>Moraxella catarrhalis</i> na čokoládovém agaru.....	39
Obrázek 9: Endoskopický obraz tympanické membrány různých forem <i>otitis media</i>	40
Obrázek 10: Typické otoskopické nálezy na tympanické membráně při <i>otitis media acuta</i> ..	41
Obrázek 11: Tympanostomická trubice	47
Obrázek 12: Vrozená forma cholesteatomu středního ucha.....	49
Obrázek 13: Bruntonův auriskop	54
Obrázek 14: Ruční otoskop	54
Obrázek 15: Otomikroskopie tvorby biofilmu obarveného toluidinovou modří	55
Obrázek 16: Tympanogramy pravého a levého ucha kojence trpícího <i>otitis media chronica suppurativa</i>	56
Obrázek 17: Provedení pneumatické otoskopie	57
Obrázek 18: Snímky tympanické membrány pomocí optické koherentní tomografie.....	59

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AOM	Akutní zánět středního ucha (z <i>angl.</i> A cute <i>O</i> titis <i>M</i> edia)
COM	Chronický zánět středního ucha (z <i>angl.</i> C hronic <i>O</i> titis <i>M</i> edia)
CSOM	Chronický hnisavý zánět středního ucha (z <i>angl.</i> C hronic S uppurative <i>O</i> titis <i>M</i> edia)
CWD	C anal W all D own mastoidektomie
CWU	C anal W all U p mastoidektomie
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (z <i>angl.</i> D eoxyribonucleic A cid)
EPS	E xtracelulární P olymerní S ubstance
ET	E ustachova T rubice
Fc	Krystalizovatelný fragment (z <i>angl.</i> C rystallizable F ragment)
MID/Hag	Protein vázající imunoglobulin D (z <i>angl.</i> <i>Moraxella</i> I gD-Binding Protein)
NTHi	Netypovatelný <i>Haemophilus influenzae</i> (z <i>angl.</i> N on- T ypeable <i>H</i> aemophilus <i>i</i> nfluenzae)
OM	<i>O</i> titis <i>m</i> edia
OMC	Zánět středního ucha s tvorbou cholesteatomu (z <i>angl.</i> <i>O</i> titis <i>M</i> edia with C holesteatoma)
OME	Zánět středního ucha s výpotkem (z <i>angl.</i> <i>O</i> titis <i>M</i> edia with E ffusion)
PCR	Polymerázové řetězové reakce (z <i>angl.</i> P olymerase C hain R eaction)
QS	Snímání hustoty buněčné populace (z <i>angl.</i> Q orum S ensing)
RNA	Ribonukleová kyselina (z <i>angl.</i> R ibonucleic A cid)
UspA1	Všudypřítomný povrchový protein A1 (z <i>angl.</i> U biqutous S urface P rotein A 1)
UspA2	Všudypřítomný povrchový protein A2 (z <i>angl.</i> U biqutous S urface P rotein A 2)
UspA2H	Hybrid všudypřítomného povrchového proteinu A2 (z <i>angl.</i> U biqutous S urface P rotein A 2 – H ybrid)

ÚVOD

Bakteriální biofilm představuje multimikrobiální komunitu obklopenou extracelulární polymerní substancí. Tato substance poskytuje biofilmu pevnost a ochranu a zároveň umožňuje výměnu živin či signálních molekul. Bakterie v této struktuře komunikují a koordinují své chování pomocí mechanismů nazývaných *quorum sensing*, což je důležitý proces pro vývoj a stabilitu biofilmu. Bakteriální buňky ve formě biofilmu jsou odolnější vůči vnějším vlivům a jsou tak příčinou vzniku mnoha onemocnění včetně *otitis media*. Tvorba bakteriálního biofilmu je složitý proces zahrnující adhezi mikroorganismů na povrch, následovanou produkcí extracelulární matrix a formaci mikrokolonií. Následná disperze biofilmu vyvolaná mnoha faktory vede k uvolnění jednotlivých mikroorganismů do okolního prostředí. Disperze biofilmu může mít důležité klinické důsledky přispívající k tvorbě infekcí a šíření chorob. Detekce bakteriálního biofilmu je klíčová pro diagnostiku a terapii infekcí vyvolaných tvorbou těchto struktur. Existuje několik metod pro detekci biofilmu vč. molekulárně-biologických metod, mikroskopických technik a kolorimetrických testů umožňujících identifikaci a kvantifikaci bakteriálních biofilmů. Tvorba biofilmů má významný dopad na klinickou praxi, zejména v souvislosti s antibiotickou rezistencí. Nemoci spojené s biofilmem zahrnují onemocnění způsobená tvorbou a přítomností bakteriálního biofilmu na tkáních nebo površích v lidském těle. Mezi tyto nemoci patří např. infekce močových cest, infekce ran, cystická fibróza nebo infekce související s infikovanými implantáty.

Zánět středního ucha je poměrně běžné onemocnění postihující nejčastěji dětskou populaci a může se vyskytovat jak v akutní, tak i v chronické formě. Jiné formy *otitis media* (OM) zahrnují tvorbu výpotku či patologické struktury (cholesteatomu). Mezi nejčastější patogeny spojené s touto infekcí patří *Streptococcus pneumoniae*, netypovatelné kmeny *Haemophilus influenzae* a *Moraxella catarrhalis*. Tyto bakterie mohou vstoupit do sluchové trubice a způsobit zánět charakterizovaný bolestí, výtokem z ušní dutiny či zhoršením sluchu. Perzistence biofilmů zejména těchto bakterií v dutině středního ucha představuje klíčový faktor v odolnosti vůči antibiotické terapii, což činí *otitis media* obtížně léčitelným a často recidivujícím. Tvorba bakteriálního biofilmu má značný dopad též na diagnostiku tohoto onemocnění a prevenci před vznikem tohoto onemocnění.

Diagnostika *otitis media* a identifikace původců tohoto onemocnění představuje klíčový krok pro správné terapeutické postupy a prevenci možných komplikací. Pro diagnostiku *otitis media* jsou k dispozici různé metody a techniky. Mezi ně patří klasická otoskopie umožňující vizuální

posouzení tympanické membrány a přítomnosti tekutiny v ušní dutině. Důležitou roli hraje také tympanometrie poskytující informace o tlaku vzduchu v uchu a stavu ušního bubínku. Při diagnostice *otitis media* je klíčové identifikovat možné původce onemocnění. Identifikace původců tohoto onemocnění zahrnuje různé diagnostické testy vč. kultivačních metod a PCR analýzy.

V neposlední řadě jsou popsány možnosti prevence vzniku *otitis media*. Prevence před vznikem zánětu středního ucha je klíčová pro minimalizaci rizika vzniku tohoto bolestivého a potenciálně komplikovaného onemocnění. Jedním z hlavních preventivních opatření je očkování. Očkování proti běžným původcům *otitis media* může výrazně snížit riziko vzniku infekce středního ucha. Pravidelné očkování podle doporučeného očkovacího kalendáře je proto důležité zejména pro ochranu dětí. Důležitou roli v prevenci *otitis media* hraje také správná péče o dýchací cesty. Zabraňuje se tak rozvoji infekcí horních cest dýchacích vedoucím k sekundárnímu zánětu středního ucha. Vzdělávání a osvěta populace a lékařů jsou důležitými prvky prevence *otitis media*. Informování rodičů o rizikových faktorech a včasných příznacích onemocnění může přispět k prevenci infekce středního ucha a snížení zátěže spojené s léčbou a komplikacemi.

1. BAKTERIÁLNÍ BIOFILM

Bakteriální biofilm je dynamická multimikrobiální komunita. Buňky jsou v této struktuře ireverzibilně připojeny k substrátu a jsou obklopeny ochrannou vrstvou (Sharma *et al.*, 2023). Bakterie jsou ve formě biofilmu metabolicky méně aktivní, ale v rozptýlené formě jsou virulentnější (Loughran *et al.*, 2019). V klinické praxi jsou bakteriální biofilmy často zodpovědné za vznik nozokomiálních chronických infekcí (Sharma *et al.*, 2023).

Dříve se předpokládalo, že mikroorganismy existují pouze v planktonní formě (Su *et al.*, 2022). Antoni van Leeuwenhoek pozoroval již v roce 1683 povrchově asociované bakterie pomocí primitivního mikroskopu a popsal tak biofilmy ze stěru vlastních zubů. Avšak slovo „biofilm“ bylo použito a definováno až v rukopisu Williama Costertona (Sharma *et al.*, 2023; Vestby *et al.*, 2020). Vlastnosti biofilmů nebyly pro lékařské mikrobiology akceptovatelné až do počátku 70. let 20. století. V tomto období Nils Høiby identifikoval spojitost mezi příčinou perzistující infekce a biofilmy u pacientů s cystickou fibrózou. Od té doby došlo k mnoha pokrokům ve výzkumu a biofilmy byly tak identifikovány jako podílející na mnoha klinických infekcích a přispívající k patogenezi chronických infekcí (Vestby *et al.*, 2020). Význam biofilmů uznala American Society for Microbiology v roce 1993. V roce 1999 Costerton dále popsal biofilm jako systematicky uspořádanou skupinu mikrobů obklopenou polymerní maticí (Sharma *et al.*, 2023).

Biofilm obsahuje typicky dvě jasně oddělené vrstvy, a to základní a povrchovou vrstvu. Povrchová vrstva funguje jako disperzní zóna šířící infekci do svého okolí. Buňky v biofilmu jsou obklopeny extracelulární polymerní substancí (EPS) produkovanou samotnými bakteriemi. Mezi mechanismy podporující odolnost biofilmů patří tvorba shluků buněčných agregátů či produkce endotoxinů. Ideálním prostředím pro vývoj biofilmových struktur je povrch poskytující dostatečnou vlhkost a živiny (Sharma *et al.*, 2023). Součástí biofilmů *in vivo* mohou být houby, viry i více druhů bakterií zapojených do extracelulární polymerní matrice. V rámci polymikrobiálních biofilmů tak dochází k mezidruhovým interakcím (Anju *et al.*, 2022; Vermeë *et al.*, 2019). Tyto interakce mezi mikroorganismy hrají klíčovou roli při formování struktury biofilmu. Pokud mikroby navzájem spolupracují nebo se mezi nimi vytvoří vzájemné vztahy (komezialismus), interakce může mít i pozitivní vliv. Počáteční kolonizace jednoho druhu přispívá k následné kolonizaci dalších bakterií. Jeden druh bakterií připravuje povrch substrátu a spouští proces společné agregace, což umožňuje adhezi dalšího druhu. Koagregace těchto mikroorganismů může být uskutečněna vazbou na specifické

povrchové molekuly biofilmů prostřednictvím koordinace mezi bakteriemi nebo preferencí některých fenotypových změn. Tento proces přispívá k rozšíření produkce matrice biofilmu a maximálnímu pokrytí povrchu substrátu, čímž chrání biofilm např. před působením antibiotik (Anju *et al.*, 2022).

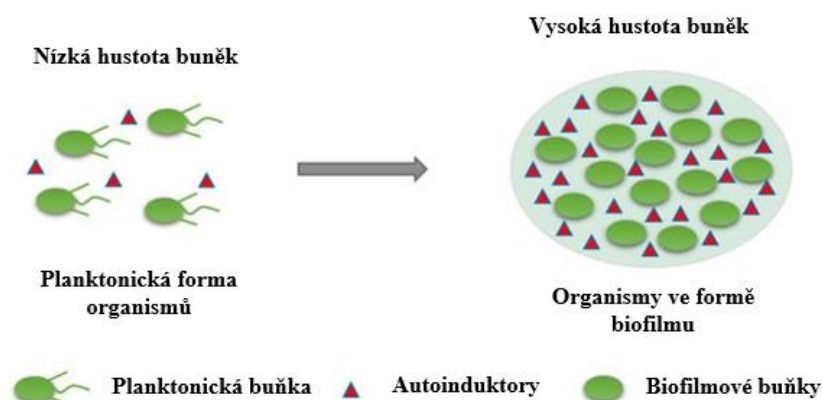
Některé bakterie mají schopnost sekrece pigmentu. Např. *Staphylococcus aureus* produkuje stafylokokové xantofyly vedoucí ke světle žlutému nebo světle zelenému zbarvení biofilmů. Z tohoto důvodu lze biofilmy v některých situacích pozorovat pouhým okem jako tenkou vrstvu nažloutlého poloprůhledného želatinového materiálu (Liu *et al.*, 2024).

1.1. Struktura a složení biofilmu

Bakteriální biofilmy jsou složeny přibližně z 10 % mikrobiální hmoty a 90 % vody (Sharma *et al.*, 2023). Mikrobiální hmota zahrnuje extracelulární polymerní substanci tvořenou proteiny, polysacharidy, DNA a RNA či extracelulární DNA (eDNA) (Vestby *et al.*, 2020). Tyto složky společně vytvářejí robustní a rezistentní strukturu biofilmu. Extracelulární polymerní substance představuje významnou komponentu biofilmů poskytující specifický slizký charakter se schopností podporovat ireverzibilní bakteriální adhezi (Li *et al.*, 2023; Srinivasan *et al.*, 2021). Mikroorganismy ve formě biofilmů mají díky této ochranné bariéře schopnost unikát imunitnímu systému hostitele a přetrvávat v lidském organismu (Sharma *et al.*, 2023). Složení EPS se mění s typem patogenů, stářím biofilmu a podmínkami prostředí jako je vlhkost, pH, množství kyslíku a dusíku, teplota a dostupnost živin. Extracelulární polymerní substance vytváří strukturu umožňující fyzické spojení mezi buňkami a povrchem. Zároveň tato substance plní roli bariéry oddělující buňky biofilmu od okolního prostředí. Další funkcí EPS je ochrana mikrobů před chemikáliemi, vysycháním, zářením a nepříznivými podmínkami prostředí. Důležitou složkou EPS je extracelulární DNA. Přítomnost eDNA zvyšuje stupeň strukturální pevnosti a stability biofilmů a zajišťuje výměnu genetických informací. Současně eDNA plní roli zdroje živin pro biofilmovou komunitu (Srinivasan *et al.*, 2021). Tato eDNA je schopna se spojit s EPS za vzniku makromolekulárního konjugátu. Během procesu tvorby biofilmu poskytuje tento komplex buňkám odolnost vůči stresu a dále usnadňuje počáteční adhezi buněk a následné vytvoření architektury extracelulární matrice. Extracelulární polymerní substance chrání konjugovanou DNA před degradací hydrolázami nukleových kyselin, což vede k větší stabilitě eDNA v nativní extracelulární matici biofilmů (Ciofu *et al.*, 2017).

Řetězce polysacharidů jsou spolu protkány v husté síťovité struktuře a jejich hydroxylové skupiny vzájemnou interakcí zvyšují mechanickou pevnost biofilmů. Struktura biofilmů může obsahovat kladně nabitě ionty. Jedná se především o vápenaté nebo hořečnaté ionty tvořící podpůrné můstky mezi polymery umožňující biofilmům růst do tloušťky až 300 μm . V jiných případech mohou mít polysacharidy v biofilmech neutrální nebo polyaniontovou povahu. Dále mohou biofilmy obsahovat D-glukuronovou, D-galakturonovou a mannuronovou kyselinu nebo acylovaný pyruvát. Díky těmto pyruvátům mají biofilmy aniontové vlastnosti. Aniontové vlastnosti umožňují asociaci dvojmocných kationtů k provázaným vláknům polymeru a poskytují větší vazebnou sílu zralému biofilmu (Sharma *et al.*, 2023).

Bakterie používají jako hlavní signální mechanismus pro komunikaci mezi buňkami *quorum sensing* (QS), jehož ukázka je uvedena na Obrázku 1. Tato chemická komunikace mezi bakteriálními buňkami zprostředkovává produkci, uvolňování a akumulaci extracelulárních signálních molekul. Chemické signální molekuly se nazývají autoinduktory. Autoinduktory jsou neustále produkovány bakteriálními buňkami a s rostoucím počtem buněk narůstá i koncentrace těchto signálních molekul (Liu *et al.*, 2023). Proces QS a tvorba biofilmů jsou na sobě vzájemně závislé. Aktivované geny mikroorganismů řízené QS způsobují vývoj biofilmu a následně koordinují jeho zrání a rozpad. Mechanismus QS může v biofilmu fungovat pouze tehdy, pokud jeho určitá část obsahuje minimální množství bakterií (Sharma *et al.*, 2023).



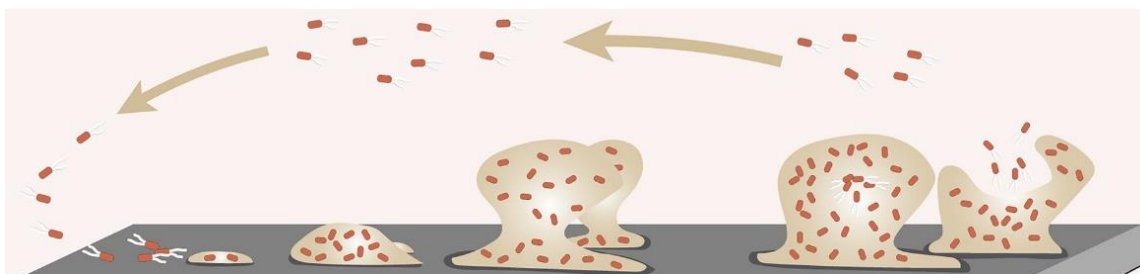
Obrázek 1: Ilustrace *quorum sensing* (upraveno dle Liu *et al.*, 2023)

Gram-negativní bakterie produkují jako signální molekuly acylovaný homoserin lakton. Tyto molekuly mají schopnost volně difundovat přes vnitřní i vnější membránu buněk. Pokud je dosaženo vysoké koncentrace těchto látek, difundují do sousedních buněk a vážou se na receptory transkripčních proteinů, čímž aktivují proces transkripce.

Gram-pozitivní bakterie využívají krátké peptidy jako signální molekuly procházejí posttranslačním zpracováním. Tyto peptidy jsou známy jako autoindukující peptidy. Autoindukující peptidy jsou po své syntéze v buňkách nejprve zpracovány a poté vyloučeny do extracelulárního prostoru. Pokud tyto látky dosáhnou vysoké extracelulární koncentrace, vážou se na membránově vázaný dvousložkový histidinkinázový receptor. Po navázání na tento receptor dochází k autofosforylaci, při které se fosfát přenesse na asociovaný regulátor v cytoplasmě. Tento regulátor pak dále aktivuje receptorové kinázy, čímž se spustí transkripce genů zapojených do regulace *quorum sensing*. Autoindukující peptidy mohou být transportovány zpět do cytoplazmy buněk a interagovat s transkripčními faktory modulujícími genovou expresi. Dvousložkové histidinkinázové receptory v periplasmě rozpoznají tyto látky díky specifickým vazebným proteinům a dojde ke vzniku vazby. Tento vzniklý komplex se naváže na sensorovou kinázu aktivující fosfotransferovou kaskádu regulující transkripci (Banerjee *et al.*, 2020).

1.2. Tvorba biofilmu

Tvorba biofilmů je složitý vícestupňový proces, ve kterém se vzájemně ovlivňují adhezivní a dezorganizační síly (Alves-Barroco *et al.*, 2020). Schéma tohoto procesu je znázorněno na Obrázku 2. Biofilmy se tvoří zejména v prostředí turbulentního proudění, ve kterém Reynoldsovo číslo převyšuje 5000. Reynoldsovo číslo je bezrozměrné číslo používané v mechanice tekutin. Toto číslo vyjadřuje poměr setrvačných sil k viskózním silám a umožňuje předpovídat charakteristiky proudění tekutin v různých situacích. Nižší hodnota Reynoldsova čísla naznačuje laminární proudění a vyšší hodnota naopak ukazuje na turbulentní proudění. Právě turbulentní proudění zvyšuje tvorbu biofilmu (Sharma *et al.*, 2023).



Obrázek 2: Schéma tvorby biofilmu (upraveno dle Liu *et al.*, 2024)

Fáze mikrobiální adheze je první fází tvorby biofilmů, během níž dochází k adhezi planktonních bakterií v zásadě na jakýkoliv povrch (Alves-Barroco *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2023). Bakterie se přichytí k povrchu prostřednictvím bakteriálních struktur (bičíky, pili apod.) nebo fyzikálních sil (Sharma *et al.*, 2023). Bičík je vláknitá struktura poskytující bakteriím energii a podporuje interakci mezi bakteriemi a povrchem. Tuto interakci umožňuje připojením k povrchu biomateriálů, či snižováním odpudivé síly mezi buňkami a povrchem. U bakterií jako je *Staphylococcus epidermidis* reguluje trvalou buněčnou adhezi polysacharidový intercelulární adhesin (Li *et al.*, 2023). Stupeň přilnavosti bakterií k povrchu se řídí širokým spektrem okolností včetně materiálového složení, povrchových vlastností bakteriální buňky, teploty a tlaku. Fyzikální síly řídící stupeň adheze mohou být síly hydrofobní, sterické, elektrostatické, adheze proteinů či Van der Waalsovy. Adheze bakterií k povrchu je v této fázi reverzibilní (vratná) (Sharma *et al.*, 2023).

Bakterie jsou díky adhezivním faktorům schopné z přisedlé formy přecházet zpět do formy planktonní. Avšak pokud vznikají mezi konkrétními adheziny a povrchem molekulárně koordinované vazby, adheze bakteriálních buněk k povrchu se přeměňuje na ireverzibilní (nevratná). Z tohoto důvodu je tato fáze tvorby biofilmu nazývána jako **fáze ukotvení**. V této fázi podléhají volně spojené mikroorganismy adhezivnímu procesu vytvořením extracelulární polymerní substance. Planktonní bakterie jsou v této fázi schopny přilnout k různým druhům povrchově vázaných organismů i k sobě navzájem. Tato schopnost vede k agregaci organismů na substrátu (Sharma *et al.*, 2023).

Vznik mikrokolonií nastává ve fázi, pokud se bakteriální buňky po přilnutí k povrchu stabilizují a pokračují v proliferaci a produkci mezibuněčné hmoty (Li *et al.*, 2023). Tento proces je spuštěn specifickou chemickou signalizací. Komunity mikroorganismů vzájemně spolupracují a dochází tak k výměně substrátů, proudění významných metabolických produktů a eliminaci metabolického odpadu. Pokud jsou přítomny minimálně tři různé druhy bakterií, může dojít např. k anaerobnímu rozkladu organických látek na metan a oxid uhličitý a následné syntrofické asociaci. Syntrofická asociace je spojení dvou nebo více metabolicky odlišných bakterií spolupracujících na využívání specifických substrátů pro své energetické potřeby. Po rozkladu složitých organických sloučenin začnou fermentující bakterie vytvářet kyseliny a alkohol z organických sloučenin. Acetogenní bakterie pak tyto substráty využívají k získání energie přeměnou octanu, oxidu uhličitého a vodíku na metan (Sharma *et al.*, 2023).

Dalším krokem v tvorbě biofilmových struktur je **fáze zrání biofilmu**. Připojené buňky v této fázi dozrávají a dále se vyvíjejí. První fáze zahrnuje kontakt mezi buňkami díky syntéze autoinduktorových signálních molekul. Připojené bakterie produkují tyto signální faktory vedoucí k expresi genů specifických pro biofilm. Podporují tak jeho zrání a zvyšují bakteriální virulenci. Druhá fáze zahrnuje zvětšování velikosti a tloušťky mikrokolonií na přibližně 100 μm (Sharma *et al.*, 2023). V této fázi je po dosažení prahové hodnoty bakteriální hustoty aktivován bakteriální QS komunikační systém. Tento systém podporuje sekreci extracelulární polymerní substance. Vzniklá substance dále pomáhá stabilizovat strukturu biofilmu a brání napadení antibakteriálními látkami a imunitními buňkami hostitele. Extracelulární polymerní substance také přispívá k tvorbě trojrozměrných struktur biofilmu. V této trojrozměrné struktuře biofilmu se tvoří dutiny a kanálky naplněné vodou. Tyto kanálky slouží k distribuci klíčových živin, přenosu molekulárních signálů a odstraňování odpadních produktů z biofilmu (Li *et al.*, 2023). Během fáze zrání mají bakterie schopnost identifikovat velikost a vzdálenost sousedících skupin, což přispívá k vytváření shluků i se sousedními buňkami. Exprese genů a proteinů je regulována převážně kompletními bakteriálními koloniemi (Sharma *et al.*, 2023).

Další fází je **disperze buněk**. Tento proces umožňuje šíření bakterií a je příčinou šíření infekce v lidském těle (Sharma *et al.*, 2023). Mechanismus disperze probíhá v několika fázích. Nejprve buňky opustí mikrokolonie a přesunou se na nový substrát, k němuž se připojí a zahájí proces tvorby nového biofilmu (Li *et al.*, 2023). Tento mechanismus se popisuje jako metastatický výsev. Mikrobiální buňky se rozšiřují do jiných částí hostitele z důvodu nedostatku zdrojů živin a přítomnosti velkého množství toxických odpadních látek (Sharma *et al.*, 2023). Pokud na bakterie působí stresové faktory jako jsou antibiotika nebo nedostatek živin, aktivně se na povrchu disociují. V tomto případě se jedná o aktivní disperzi. V biofilmech vzniká nutriční deprivací podnět pro uvolnění malých molekul cis-11-methyl-2-dodecenových mastných kyselin. Molekuly mastných kyselin následně spouštějí proces autofosforylace a aktivují degradaci cyklického diguanosinmonofosfátu. Tento kaskádní efekt vede k rozpouštění extracelulární polymerní substance ukotvující biofilm a uvolnění vrchní části planktonních buněk. Během procesu aktivní disperze dochází v důsledku syntézy bičíků k vyšší genové expresi spojené s bakteriální motilitou. Regulace exprese genů spojených s uchycením bakterií je zvýšená a odloučení bakterií je tak usnadněno. Pasivní disperze buněk závisí na vnějších faktorech jako je enzymatická degradace matrice biofilmu a mechanické smykové síly (Li *et al.*, 2023). Bakterie uvolněné z biofilmu vytváří nové biofilmy nebo se na povrchu volně pohybují a produkují proteiny, čímž se šíří infekce (Sharma *et al.*, 2023).

1.3. Detekce bakteriálního biofilmu

Infekce vyvolané biofilmem jsou obtížné detekovatelné. Bakteriální biofilm se může vyskytovat na ráně i v hlubších místech tkáně (Liu *et al.*, 2024). Z tohoto důvodu je velmi důležitá rychlá a snadno proveditelná metoda diagnostiky těchto infekcí. Infekce vyvolané v souvislosti s tvorbou biofilmu v ranách jsou i přesto často hodnoceny makroskopicky z důvodu nedostatečného mikroskopických přístrojů a kvalifikace personálu v lékařských zařízeních (Vestby *et al.*, 2020). Standardní techniky mikrobiální kultivace jsou široce používány k detekci patogenních bakterií, avšak detekce bakteriálních biofilmů pouze pomocí standardních mikrobiologických kultivačních technik je nedostatečná (Liu *et al.*, 2024).

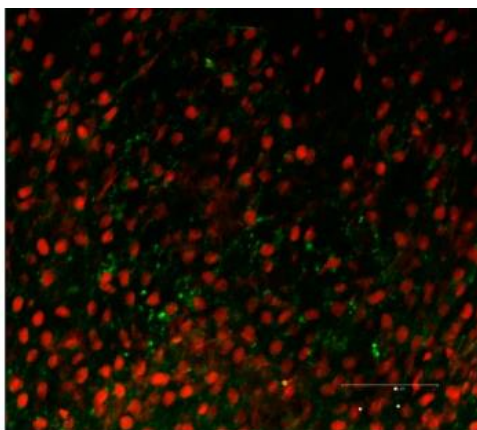
1.3.1. Molekulárně-biologické metody

Molekulárně-biologické metody dokážou specificky a citlivě identifikovat každý bakteriální druh v bakteriálním biofilmu. Avšak nevýhodou těchto technik je nemožnost odlišení planktonních bakterií od bakteriálního biofilmu (Liu *et al.*, 2024). Metoda PCR se používá k přímé detekci patogenů vytvářejících biofilmy v klinických vzorcích. Zahrnuje amplifikaci specifických oblastí, což poskytuje vysokou specifitu a citlivost při identifikaci genů zapojených do formace biofilmu po fázi disperze. Některé metody PCR zahrnují PCR v reálném čase, multiplexní PCR a PCR s reverzní transkriptázou. Dále je možné pomocí PCR identifikovat geny podílející se na formování biofilmu, jako jsou např. geny typické pro adheziny bakterií (Silva *et al.*, 2021). Pro vizuální detekci bakteriálních biofilmů slouží technologie fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) (Liu *et al.*, 2024). Tento přístup spočívá v připojení krátkých fluorescenčně značených oligonukleotidů na specifickou ribozomální RNA cílových organismů. Výhodou této techniky je možnost analýzy vzorku bez předchozí úpravy a snadná identifikace mikrobiálních shluků v mikroskopu. Fluorescenční *in situ* hybridizační metodu lze kombinovat také s konfokální laserovou skenovací mikroskopií pro vizualizaci a kvantifikaci biofilmu (Silva *et al.*, 2021).

1.3.2. Mikroskopické techniky

Mezi mikroskopické techniky použitelné ke studiu bakteriálního biofilmu patří elektronová mikroskopie, transmisní elektronová mikroskopie a laserová konfokální rastrovací mikroskopie. Tyto techniky jsou považovány za spolehlivé a objektivní nástroje pro detekci bakteriálních biofilmů (Liu *et al.*, 2024; Silva *et al.*, 2021). Díky vysokému rozlišení těchto

mikroskopických metod je možné detailně analyzovat strukturu biofilmů a tím přímo detekovat a vizualizovat biofilmy přímo v místě jejich vzniku (Silva *et al.*, 2021). Některé z těchto zobrazovacích technik vyžadují specializované přístrojové vybavení a vyškolený personál (Liu *et al.*, 2024). Rastrovací elektronová mikroskopie umožňuje fixaci, dehydrataci a barvení vzorků. Avšak v těchto procesech může dojít ke změnám morfologie a struktury biofilmu, což představuje jednu z nevýhod této techniky. Transmisní elektronová mikroskopie je často využívána k vizualizaci architektury biofilmu. Na rozdíl od rastrovací elektronové mikroskopie má výhodu v tom, že mikrobiální agregáty jsou ošetřeny pryskyřicí. Toto ošetření zvyšuje stabilitu extracelulární polymerní matrice biofilmu. Laserová konfokální rastrovací mikroskopie poskytuje kompletní 3D vizualizaci architektury biofilmu a umožňuje identifikaci makromolekul (polysacharidy, proteiny, nukleové kyseliny a lipidy), a to pomocí fluorescenčních barviv. Tato barviva zvýrazňují různé složky biofilmu včetně extracelulární matrice (Silva *et al.*, 2021). Na Obrázku 3 je zobrazena mikroskopická vizualizace touto zobrazovací technikou.



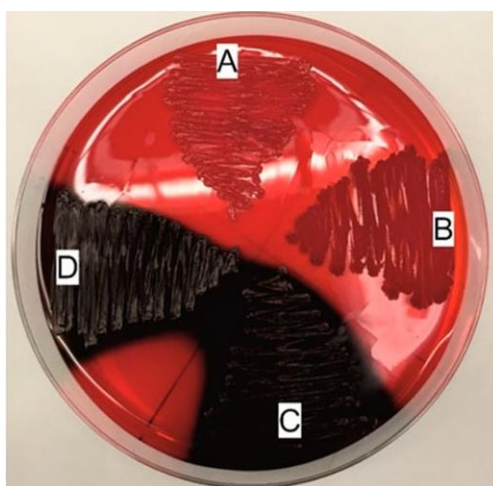
Obrázek 3: Biofilm laterální strany nosní skořepy vizualizovaný konfokální skenovací laserovou mikroskopií (epiteliální buňky – červené; bakterie – zelené) (upraveno dle Vestby *et al.*, 2020)

Při detekci biofilmu *in situ* lze použít multifotonovou laserovou skenovací mikroskopii. Jedná se o pokročilou mikroskopickou techniku umožňující analýzu biofilmu v místě vzniku, např. na katetrech a lékařských implantátech. Zároveň při této technice nedochází k deformaci mikrobiální struktury. Tato metodika zajišťuje pořizování snímků autofluorescenčních materiálů a umožňuje tak získat snímky struktury biofilmu ve vysokém rozlišení bez předchozí úpravy vzorku (Silva *et al.*, 2021). Zobrazovací techniky nukleární medicíny vyžadují vystavení pacienta ionizujícímu záření. Tyto nedostatky omezují použití těchto zobrazovacích technik v klinické praxi (Liu *et al.*, 2024).

1.3.3. Kolorimetrické testy

Kolorimetrické testy se často používají při studiích zaměřených na vývoj léčiv proti infekcím vyvolaným tvorbou bakteriálního biofilmu a pro kvantifikaci specifických struktur biofilmů. Přestože tyto metody vyžadují značné množství času a školení personálu, jsou klíčovými nástroji pro identifikaci tvorby biofilmu a lepší pochopení citlivosti biofilmů na antimikrobiální sloučeniny. Díky kolorimetrickým testům lze izoláty klasifikovat jako mikroorganismy neprodukcující biofilm a dále slabé, střední nebo silné producenty biofilmů. Klasifikace je však značně subjektivní a může se lišit v závislosti na interpretaci pracovníka (Silva *et al.*, 2021). Speciálním barvením se barví např. extracelulární polysacharidy biofilmů. Využívají se barviva jako konžská červeně nebo uhličitan zirkoničitý. Dále lze využít techniky barvení hematoxylinem-eosinem, fluoresceinem isothiokyanátem, či barvení kyselinou jodistou nebo dusičnanem stříbrným (Liu *et al.*, 2024).

Freeman *et al.* popsali alternativní přístup k detekci tvorby biofilmových struktur vyžadující použití pevného BHI (Brain Heart Infusion) média s přidavkem 5 % sacharózy a konžské červeně. Naočkované bakterie jsou inkubovány aerobně po dobu 24 až 48 hodin při 37 °C. Černá barva kolonií indikuje silnou produkci exopolysacharidů. U těchto bakterií je velice pravděpodobné, že jsou schopny utvářet biofilm. Naopak červenou barvu mají bakteriální kolonie neprodukcující exopolysacharidy. Jedná se tedy o bakterie neschopné tvořit biofilmovou strukturu (Ansari *et al.*, 2014). Tento kolorimetrický test je zobrazen na Obrázku 4.



Obrázek 4: Kolonie *Staphylococcus epidermidis* na BHI agaru doplněném o konžskou červeně (A – blokováná syntéza exopolysacharidů (negativní kontrola), B – negativní klinický vzorek; C – produkce exopolysacharidů (pozitivní kontrola); D – pozitivní klinický vzorek (Skiba-Kurek *et al.*, 2021)

Některá barviva (krystalová violet) však nebarví bakterie adekvátně (Liu *et al.*, 2024). Nevýhoda při použití tohoto barviva spočívá ve zbarvení celé struktury biofilmu bez dostatečné specifičnosti. Tato technika je proto používána zejména pro kvantifikaci celé biomasy a matrice biofilmů. Barvivo safranin naopak barví specificky mukopolysacharidy extracelulární matrice, a to díky vysoké afinitě k těmto organickým sloučeninám. Mukopolysacharidy vznikají v biofilmu a slouží jako stavební bloky extracelulární matrice. Avšak ne všechny biofilmy obsahují polysacharidy jako primární složku matrice. Každý mikroorganismus má také svůj specifický typ extracelulární matrice lišící se lokalizací v buňce, chemickým složením, charakterem a funkcí. Díky těmto faktorům není tak vždy safranin vhodný pro diagnostiku přítomnosti biofilmů (Silva *et al.*, 2021).

1.4. Význam tvorby biofilmů v klinické praxi

1.4.1. Antibiotická rezistence

Důležitým rysem bakteriálních biofilmů je jejich perzistentní charakter a necitlivost vůči imunitnímu systému i antimikrobiálním látkám (Tikhomirova a Kidd, 2013). Pokud jsou bakterie v nepříznivých podmínkách (hypoxie, nutriční nedostatek, nízká teplota nebo expozice léčivům), mohou přecházet do životaschopného, ale nekultivovatelného stavu. V tomto stavu mohou působit lokální škody na tkáních a později vyvolat akutní infekci (Liu *et al.*, 2024; Vestby *et al.*, 2020). Na anaerobní podmínky a např. nedostatek živin se bakterie v biofilmové struktuře adaptují změnou metabolismu, genovou expresí a produkcí proteinů. Tyto adaptivní vlastnosti také podporují bakteriální odolnost vůči terapii antibiotiky (Vestby *et al.*, 2020). Obecně jsou bakterie ve formě biofilmu tolerantnější k antibiotikům oproti planktonním buňkám. Tato odolnost je způsobena změnou exprese membránových transportních proteinů, převedením buněk do klidového stavu nebo mechanismem effluxní pumpy (Banerjee *et al.*, 2020).

Effluxní pumpy jsou transportní proteiny v periplazmatickém prostoru bakteriálních buněk podílející se na vypuzování látek z intracelulárního prostoru do okolního prostředí (Banerjee *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2019). Přítomnost effluxních pump hraje důležitou roli v multirezistenci vůči léčivům (Banerjee *et al.*, 2020). Effluxní pumpy jsou z energetického hlediska rozděleny na dvě kategorie. Primární effluxní pumpy využívají energii z aktivní hydrolyzy ATP a pumpy sekundární využívají chemické gradienty vytvořené protony nebo ionty jako je např. sodík (Sharma *et al.*, 2019).

Změny v expresi membránových proteinů jsou dalším mechanismem vedoucím k odolnosti bakteriálních buněk v biofilmu vůči antibiotikům (Banerjee *et al.*, 2020). Tyto membránové proteiny tvoří duté struktury zvané beta-barely s hydrofobním povrchem. Struktury beta-barely vytvářejí transmembránové póry umožňující pasivní tok hydrofilních látek. Současně tyto struktury slouží jako funkční bariéra před nepolárními rozpuštěnými látkami. Bakterie mohou tyto proteiny modifikovat a inhibovat tak influx látek membránovými kanály. Výzkumy naznačují, že malé polární molekuly s hmotností přibližně do 600 Da mají vysokou účinnost proti Gram-negativním bakteriím a poriny představují jejich primární vstupní cestu (Ghai, 2023). V bakteriálních biofilmech jsou pozorovány různé úrovně exprese genů kódujících tyto bakteriální poriny, což ovlivňuje míru rezistence vůči antibiotikům (Banerjee *et al.*, 2020). Nízká permeabilita antibiotik přes vnější membránu vyžaduje jejich vysoké dávky, což může vést ke vzniku toxických vedlejších účinků (Ghai, 2023).

Fenotypová diverzita bakterií v biofilmu je také zodpovědná za rezistenci vůči antibiotikům. Biofilmy mají zvláštní schopnost vyvíjet bakteriální subpopulace převedené do klidového stavu známého jako *small colony variants*. *Small colony variants* mají rovněž defektní katalázovou aktivitu, což narušuje jejich oxidativní metabolismus. Dále tyto klidové struktury způsobují některé morfologické změny vedoucí ke zvýšené adhezenci, autoagregaci, hydrofobicitě a nízké úrovni motility dalšího kmene (Banerjee *et al.*, 2020). Pomalu rostoucí subpopulace bakterií v čisté kultuře byly popsány již od roku 1913. Zpočátku byly tyto subpopulace považovány za morfologické varianty s vedlejší úlohou u infekčních nemocí kvůli jejich snížené patogenitě a omezené produkci faktorů virulence. Existovalo také přesvědčení, že tyto formy mohou představovat běžnou součást životního cyklu mikrobů. Po prvotní fenotypové charakterizaci nebyl patogenní potenciál *small colony variants* po mnoho desetiletí rozpoznán a jejich přítomnost v mikrobiální komunitě byla vnímána spíše jako laboratorní zvláštnost. Dřívější studie objasnily spojitost mezi těmito subpopulacemi a environmentálním stresem nebo fenotypovými změnami bakterií v biofilmové struktuře. Tyto změny zahrnovaly atypickou morfologii kolonií, sníženou rychlost růstu, nedostatečnou pigmentaci, sníženou hemolytickou aktivitu, koagulázovou aktivitu a snížené využití sacharidů, nízký virulenční potenciál a zvýšenou rezistenci vůči antibiotikům. Rychlost růstu *small colony variants* je přibližně devětkrát nižší oproti rychlosti růstu původních (progenitorových) organismů. Dnes jsou tyto subpopulace lépe definovány jako přirozeně se vyskytující, pomalu rostoucí různorodé subpopulace bakteriálních morfotypů. Subpopulace převedené do klidového stavu jsou obtížně detekovatelné pomocí běžných diagnostických testů. Kliničtí mikrobiologové

spoléhají na standardní růstové vlastnosti mikrobů a často tak tyto subpopulace přehlížejí. Tato problematika může mít závažné následky, jelikož předčasné ukončení antimikrobiální terapie může umožnit *small colony variants* přežít a vyvolat recidivující nebo chronické infekce (Johns *et al.*, 2015). Klasickými příklady využívající tento mechanismu jsou *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. a některé druhy *Enterobacteriaceae* (Banerjee *et al.*, 2020).

Antibiotická rezistenci bakterií může být způsobena také elektrostatickým nábojem extracelulární polymerní substance přitahující opačně nabitá antibiotika a inaktivací antibiotik enzymy vylučovanými bakteriemi (Srinivasan *et al.*, 2021).

1.4.2. Nedostatečná imunitní odpověď hostitele

Pokud je hostitel infikován patogeny ve formě biofilmu, může dojít k současné aktivaci vrozených i získaných imunitních reakcí. Přestože jsou aktivovány obě složky imunitní odpovědi, ani jedna efektivně neeliminuje infekci. Naopak dochází k synergickému poškození tkání (Banerjee *et al.*, 2020). V důsledku toho jsou onemocnění související s biofilmem typicky perzistujícími infekcemi (Vestby *et al.*, 2020). Některé reakce pozorované v rámci vrozené (přirozené) imunitní odpovědi zahrnují zánět dýchacích cest, akumulaci, penetraci, fagocytózu a likvidaci bakteriálního biofilmu. Jako odpověď imunitního systému se v dýchacích cestách hostitele hromadí aktivované neutrofilů. V důsledku aktivního respiračního vzplanutí spojeného s intenzivní akumulací těchto neutrofilů v těsné blízkosti biofilmu dochází k prudkému poklesu kyslíku. Dochází tak k redukci molekulárního kyslíku na toxický superoxid poškozující tkáň. Infekce způsobené tvorbou biofilmu odolávají všem typům uvolněných protilátek, látkám přitahujícím buňky imunitního systému hostitele i aktivovaným a opsonizovaným fagocytům. Hostitelské buňky uvolňují kromě určitých patogenních faktorů virulence také faktory zahrnující proteázy a další exoenzymy, což vede k degradaci důležitých povrchových molekul imunitních buněk. Postupně se tak narušuje antibiofilmová účinnost imunitního systému hostitele. Tato reakce může způsobit poškození tkáně v důsledku produkce množství neutralizujících protilátek proti faktorům virulence bakterií (Banerjee *et al.*, 2020).

1.4.3. Vybraná onemocnění spojená s tvorbou biofilmu

Infekce v souvislosti s implantáty představují jeden z problémů v klinické praxi. Lékařské implantáty přispěly v medicíně k zásadnímu pokroku, avšak současně přinesly zvýšené riziko infekcí způsobených umístěním cizích těles do lidského těla (Maillard a Centeleghe, 2023). Tato umělá zařízení částečně nebo zcela vložená do lidského těla jsou určena k diagnostickým, terapeutickým či rehabilitačním účelům. Lékařské implantáty zahrnují implantáty prsní, zubní, kardiovaskulární (např. protetické srdeční chlopně), intravaskulární gastrointestinální, urologické. Nitroděložní tělíška i ortopedická zařízení (např. protetická kolena a kyčle) mohou také představovat tento problém. Pokud jsou tyto implantáty kontaminované, mohou se na jejich povrchu vytvářet mikrobiální biofilmy (Weber *et al.*, 2023). Po dosažení zralosti biofilmové struktury na infikovaném implantátu v těle se bakterie začnou rozptylovat, některé vstoupí do krevního řečiště a způsobí tak vážnou infekci (Maillard a Centeleghe, 2023). Tvorba těchto biofilmů taktéž vede ke snížené citlivosti organismu hostitele na antibiotickou terapii a ke zvýšené odolnosti vůči biocidním látkám (Weber *et al.*, 2023). Biofilmy tak hrají důležitou roli v rozvoji infekcí spojených se zavedením katetrů a s chirurgickými zákroky (Maillard a Centeleghe, 2023).

Infekce ran mají také významnou souvislost s tvorbou biofilmů. Jedná se především o odřeniny, popáleniny nebo řezné rány. Dříve se předpokládalo, že infekce ran jsou způsobeny planktonními bakteriemi. Avšak nedávné studie naznačují, že chronické infekce ran jsou ve skutečnosti způsobeny bakteriemi rostoucími v biofilmech. Hodnocení infekcí ran způsobených tvorbou biofilmu často zahrnují makroskopické metody, jako je např. lesklý nebo matný vzhled rány. Nicméně tyto makroskopické znaky jsou velice subjektivní, což představuje výrazné omezení (Vestby *et al.*, 2020). Biofilmy pokrývají povrchy těchto ran, ale vyskytují se i v podložní tkáni. Hloubka kolonizace biofilmu se u různých druhů bakterií liší v závislosti vztahu ke kyslíku (Liu *et al.*, 2024). Např. aerobní bakterie jako *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Pseudomonas aeruginosa* se často vyskytují na povrchu chronických ran (Vestby *et al.*, 2020). Anaerobní bakterie jako jsou *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp. a *Clostridium* spp. se vyskytují naopak ve výrazně hlubší vrstvě oproti bakteriím aerobním (Liu *et al.*, 2024; Vestby *et al.*, 2020). Tato charakteristika hluboké kolonizace ran může být důležitým faktorem vedoucím k perzistentnímu zánětlivému procesu v ráně. Biofilm na povrchu rány lze snadno odstranit metodami mechanického odstranění poškozené tkáně. Avšak po tomto zákroku zůstávají v ráně

ne zcela eradikované planktonní buňky. Tyto bakterie jsou schopné rychle obnovit svou činnost a produkovat biofilm se zvýšenou odolností vůči antimikrobiálním látkám (Liu *et al.*, 2024).

Cystická fibróza je autozomálně recesivní genetická porucha zodpovědná za narušení normální funkce plic. Toto onemocnění postihuje proteiny transmembránových regulátorů, což vede k defektní sekreci hlenu v respiračním epitelu. Následkem defektní sekrece hlenu vznikají potíže s dýcháním (Banerjee *et al.*, 2020). Bakterie *Staphylococcus aureus* a *Haemophilus influenzae* kolonizují dýchací cesty především mladých osob. Při nadměrné produkci viskózního hlenu dochází k poklesu dostupnosti kyslíku, což vytváří vhodné anaerobní podmínky pro bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (Mirzaei *et al.*, 2020; Vestby *et al.*, 2020). V reakci na přítomnost biofilmů je do plic infiltrováno velké množství polymorfonukleárních leukocytů způsobujících chronický zánět s následným poškozením tkáně, ztrátou funkce plic a obstrukcí dýchacích cest (Vestby *et al.*, 2020).

Infekční endokarditida je obtížně léčitelné onemocnění, za které jsou nejčastěji zodpovědné stafylokoky, streptokoky a enterokoky (Mirzaei *et al.*, 2020; Vestby *et al.*, 2020). Charakteristickým nálezem u infekční endokarditidy jsou biofilmové bakterie zabudované do extracelulárního matrice složené z fibrinu a krevních destiček (Di Domenico *et al.*, 2022). Toto onemocnění probíhá ve třech fázích. Začíná prosakováním srdečních chlopní bakteriální vegetací, což narušuje jejich běžnou funkci. Tento stav vyvolává infekci krevního oběhu vedoucí k opakovaným horečkám, chronickým systémovým zánětům a dalším vážným komplikacím. V některých případech se biofilmová struktura rozpadne a planktonní bakterie se transportují oběhovým systémem do jiných částí těla (např. mozek a ledviny). Tento proces se označuje jako embolizace (Banerjee *et al.*, 2020). Perzistentní buňky v hlubších vrstvách biofilmové struktury přežívají navzdory terapii antibiotiky, a proto je zpravidla nutná chirurgická léčba (Di Domenico *et al.*, 2022).

Zubní kaz je příkladem onemocnění způsobeného dysbiózou dentálního mikrobiomu. Mikrobiom dutiny ústní se je komplexní sbírka mikroorganismů poskytujících svému hostiteli zásadní výhody. Avšak tuto symbiózu mohou narušit změny v orálním prostředí vedoucí ke změnám složení dentálního biofilmu. Původní složky biofilmu se mohou stát schopnějšími a dokonce početnějšími, což ve většině případů vede ke vzniku onemocnění (Head *et al.*, 2023). *Streptococcus mutans* byl označen jako hlavní patogen spojený se vznikem zubního kazu. Tento mikrob produkuje glukosyltransferázy štěpící sacharózu z potravy a přeměňuje jí na glukanové polymery, což přispívá k vytvoření matricové struktury biofilmu. Vytvořené extracelulární

polymery touto bakterií podporují růst biofilmu, rezistenci vůči antimikrobiálním látkám a rozvoj onemocnění. Zároveň dochází ke snížení pH a následnému narušení fyziologické a chemické rovnováhy mezi koncentrací zubního minerálu a iontů v biofilmu. Z klinického hlediska tak dochází ke ztrátě zubní tkáně či vzniku kavitací (dutin) (Bertolini *et al.*, 2022).

Infekce močových cest vzhledem k blízkosti rekta, pochvy a močové trubice postihují převážně ženy (Mirzaei *et al.*, 2020; Vestby *et al.*, 2020). Nejčastějšími bakteriemi způsobující infekci močových cest jsou uropatogenní *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. a *Staphylococcus saprophyticus*. U katetrizovaných pacientů jsou častými původci infekce *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp. a *Candida* spp. (Mirzaei *et al.*, 2020). Z důvodu absence estrogenu zásadního pro podporu kyselosti vaginální tekutiny jsou k infekcím močových cest náchylnější ženy po menopauze. Kyselost vaginální tekutiny je klíčová pro růst *Lactobacilů* (významných složek obranných mechanismů lidského těla) (Mirzaei *et al.*, 2020). Bakterie pronikají do močových cest a mohou se množit v močové trubici, močovém měchýři, močovodech a ledvinách. Příznaky se liší podle lokalizace infekce, ale obvykle zahrnují časté nutkání k močení, pálení při močení, bolest v dolní části břicha a mohou se objevit i systémové příznaky a sepse (Vestby *et al.*, 2020). Akutní infekce močových cest způsobená bakteriálními patogeny může vést k recidivě v důsledku reinfekce stejným nebo jiným bakteriálním kmenem (Mirzaei *et al.*, 2020). Příčiny chronických či opakujících se infekcí nejsou zcela jasné, ale byla zvažována opakovaná kolonizace bakteriemi z oblasti rekta, perinea nebo z vaginálního prostředí. Mikroskopické metody v kombinaci s fluorescenčně značenými bakteriemi a specifickými metodami barvení pro fimbrie a polysacharidy odhalují velké výčnělky na urotelu. Tyto výčnělky se skládají z bakteriálních populací obklopených maticí polysacharidů a fimbriálních proteinů. Uropatogenní *Escherichia coli* podstupuje cykly invaze epiteliálních buněk, po nichž následuje proliferace intracelulárních bakteriálních komunit a disperze buněk do lumen močového měchýře. Tato disperze umožňuje bakteriální kolonizaci sousedních buněk a následně dochází k perzistenci infekce močových cest (Vestby *et al.*, 2020).

2. **OTITIS MEDIA**

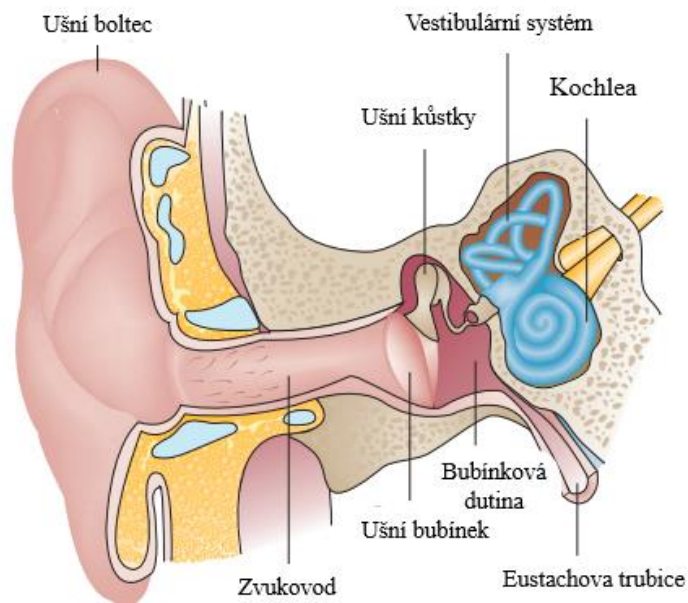
Zánět středního ucha neboli *otitis media* patří mezi celosvětově nejčastější onemocnění postihující středoušní dutinu a ušní kůstky zejména u malých dětí. Toto onemocnění může být bakteriálního nebo virového původu. Běžně se vyskytující bakterie na povrchu nosohltanu nezpůsobují poškození zdraví až do doby iniciace zánětlivých procesů prostřednictvím virů a následného přesunu bakterií do středního ucha. Mezi tyto viry patří respirační syncytiální viry, rhinoviry, adenoviry, koronaviry, bokaviry, viry chřipky a parachřipky, enteroviry nebo humánní metapneumoviry (Schilder *et al.*, 2016).

Zánět středního ucha se může projevit v akutní nebo chronické formě. Další formy toho onemocnění se mohou projevit tvorbou výpotku, hnisáním v ušní dutině nebo tvorbou patologické struktury (cholesteatomu). Zánět středního ucha může spontánně odeznít bez komplikací nebo může být naopak spojen se ztrátou sluchu a celoživotními následky (Schilder *et al.*, 2016). Zánětlivé mediátory u *otitis media* se podílejí na invazi imunitních buněk (neutrofilů, monocytů a lymfocytů) a také na interakci s lokálními buňkami (keratinocyty a astocyty). Tyto interakce epiteliálních a imunitních buněk mohou způsobit různé komplikace poškozující spánkovou kost (Jung *et al.*, 2021). K chronické a recidivující povaze tohoto onemocnění ve středním uchu přispívá tvorba bakteriálních biofilmů. Tyto komplexní struktury jsou extrémně odolné vůči obranným mechanismům hostitele a vykazují rezistenci vůči běžné antimikrobiální terapii (Novotny *et al.*, 2019). Terapie *otitis media* zahrnuje farmakologické a chirurgické postupy (Jamal *et al.*, 2022).

2.1. **Anatomie a histologie sluchového aparátu**

Sluchový aparát lze rozdělit na tři hlavní části, a to vnější, střední a vnitřní ucho. Vnější ucho se skládá z ušního boltce a zvukovodu. Vnější a střední ucho odděluje ušní bubínek (tympanická membrána) (Schilder *et al.*, 2016). Právě tato membrána je v lidském těle jedinou membránou obklopenou vzduchem z obou stran. Tympanická membrána se skládá ze tří odlišných vrstev, a sice vrstevnatého dlaždicového epitelu, vláknité vrstvy *lamina propria* a bazální slizniční vrstvy. *Lamina propria* poskytuje membráně stabilitu díky extrémně pevným kolagenovým vláknům, jež probíhají třemi směry (radiálně, koncentricky a tečně). Bazální slizniční vrstva je propojena s epitelem středního ucha (Isaacson, 2018; Luers a Hüttenbrink, 2016).

Střední ucho se skládá z bubínkové dutiny a ušních kůstek (*malleus, incus a stapes*) připojených k tympanické membráně. Vestibulární systém spojuje střední ucho s vnitřním uchem, v němž jsou přítomny polokruhové kanálky a kochlea (Schilder *et al.*, 2016). Kochlea zodpovídá za vjemy zvuků, zatímco polokruhové kanálky zodpovídají za vnímání rovnováhy (Ekdale, 2016). Uložení těchto struktur ve sluchovém aparátu je zobrazeno na Obrázku 5.



Obrázek 5: Anatomie sluchového aparátu (upraveno dle Schilder *et al.*, 2016)

Kochleu tvoří tři řady vnějších vláskových buněk a jedna řada vnitřních vláskových buněk. Funkcí vnějších vláskových buněk je zesilování a ladění zvukových vln, zatímco vnitřní vláskové buňky se podílejí na přeměně mechanické energie zvuku na elektrický impuls přenášený do sluchového nervu. Vnější vláskové buňky, a to zejména buňky v bazální části kochleárního orgánu odpovídají za vysokofrekvenční sluch a vykazují největší citlivost k toxickým účinkům či ototoxickým látkám. Jakékoliv poškození obou typů vláskových buněk může způsobit vážné poškození sluchu s nevratnými a trvalými následky (Mittal *et al.*, 2015; Mohd Salehuddin *et al.*, 2021).

Kostěný a membranózní labyrint jsou dalšími součástmi vnitřního ucha. Membranózní labyrint obklopený tekutinou zvanou perilymfa je zavěšen v labyrintu kostěném. Perilymfa je bohatá na sodné ionty, ale chudá na ionty draselné a podobá se tak extracelulární tekutině. Kochlea a vestibulární aparát jsou naopak vyplněné tekutinou zvanou endolymfa. Tato tekutina je naopak bohatá na ionty draselné, ale chudá na ionty sodné a podobá se tak tekutině

intracelulární. Endolymfa vzniká ve specializovaných buňkách ve vysoce prokrveném epitelu podél laterální stěny kochleárního vývodu. Tento epitel zodpovídá za iontové složení endolymfy a její specifický elektrický potenciál. Endolymfa je absorbována do subdurálního prostoru kolem mozečku endolymfatickým vakem zaujímajícím prostor od vestibulárního aparátu po kochleu. Sluchové receptory v kochleárním systému a pohybové receptory ve vestibulárním systému jsou aktivovány vibracemi vytvořenými ušními kůstkami a pohyby hlavy. Endolymfa může mezi kochleárním a vestibulárním systémem proudit a ovlivňovat tak vnímání sluchu i rovnováhy (Ekdale, 2016).

Eustachova trubice (ET) spojuje dutinu středního ucha s nosohltanem. Eustachova trubice je nezbytná pro odvod sekretů z prostoru středního ucha a také pro vyrovnávání tlaku mezi vnitřním uchem a vnějším okolím (Schilder *et al.*, 2016). Epitel ET představuje jednu z obranných strategií středního ucha zabraňující otopatogenům a respiračním virům proniknout z nosohltanu. Eustachova trubice se skládá převážně z epitelu víceřadého cylindrického s řasinkami. Tento epitel produkuje antimikrobiální látky jako je např. lysozym. Pro udržení vlhkosti slizničních epiteliálních buněk a zachycování cizích částic a patogenů je nezbytný záporně nabitý mucin. Záporný náboj mucinu způsobuje přítomnost kyselých skupin (zejména sialových kyselin), které jsou částí mucinových molekul. Přítomné řasinky na epitelu pohybují zachycené patogeny v hlenu směrem k ústům a poté jsou vyloučeny z povrchu epitelu kašlem nebo polykáním (Brooks a Mias, 2018).

U kojenců a malých dětí do jednoho roku není ET plně vyvinuta, je anatomicky kratší, širší a více horizontální oproti ET dospělých (Kuo *et al.*, 2015; Schilder *et al.*, 2016). Tento faktor usnadňuje přesun otopatogenů do středního ucha a zvyšuje tak riziko vzniku *otitis media* (Schilder *et al.*, 2016). Submukózní žlázy kojenců jsou nezralé a povrchové sekreční buňky epiteliální vrstvy mají zatím nízký počet řasinkových buněk. Z tohoto důvodu je proces samočištění střední části ucha zkomplikován (Brooks a Mias, 2018).

2.2. Příčiny vzniku *otitis media*

Různé faktory vzniku *otitis media* spolu úzce souvisí a mohou se navzájem překrývat (Schilder *et al.*, 2016). Jedna z hlavních predispozic vzniku bakteriálních infekcí středního ucha jsou infekce virové. Přítomnost virové infekce je rozpoznána vrozeným imunitním systémem pomocí toll-like receptorů na povrchu buněk imunitního systému. Toll-like receptory slouží k rozpoznání specifických molekul na povrchu buněk, jako např. lipopolysacharidů specifických pro Gram-negativní bakterie. Po detekci patogenů následuje aktivace receptoru

vyvolávajícího signální dráhu prostřednictvím myeloidního diferenciačního faktoru-88. Tento faktor je klíčovým aktérem v signální dráze přenášející signál pro aktivaci transkripčního faktoru zvaného nukleární faktor-kappa B. Dále dochází ke změně nosohltanové sliznice, a to prostřednictvím modifikací imunitní funkce hostitele, navozením cytokinové aktivity, produkcí zánětlivých mediátorů (tumor nekrotizující faktor, interleukiny a fagocyty) nebo zvyšováním počtu povrchových antigenů hostitelských buněk. Antigeny na povrchu buněk představují místa pro vazbu bakterií a podporují bakteriální kolonizaci a adhezi. Současně dochází ke změně anatomické stavby Eustachovy trubice (Abdel-Razek *et al.*, 2022; Mittal *et al.*, 2018). Anatomický prostor středního ucha se v důsledku přítomnosti otoku vzniklého při zánětlivém procesu zmenší. Uzavřením nejužší části Eustachovy trubice dojde ke snížení tlaku ve středoušní dutině. V reakci na vzniklý podtlak a následnou sníženou absorpci kyslíku středoušním epitelem se začne tympanická membrána stahovat. Periodický nebo trvale vysoký podtlak tak představuje riziko dysfunkce Eustachovy trubice. Pokud není včas zajištěna účinná ventilace z důvodu přetrvávající obstrukce Eustachovy trubice, dojde k transudaci a nahromadění středoušního výpotku. Tento klinický stav umožňuje kolonizaci bakteriím, ale i dalším organismům a dochází k rozvoji dalších zánětlivých procesů. V dutině středního ucha může dojít i k otevřenému hnisavému procesu (Fireman 1997; Prakash *et al.*, 2023). Vzniklou zánětlivou reakcí dochází k masivnější produkci viskóznějšího typu mucinu. Viskóznější typ mucinu potlačuje běžný samočistící mechanismus středního ucha a dojde tak k akumulaci již hustého mucinu bohatého na výpotek. Původci onemocnění mají schopnost snižovat negativní náboj záporně nabitého mucinu díky enzymům neuraminidázám odstraňujícím přítomnou kyselinu. Patogenní bakterie unikají likvidaci antimikrobiálními proteiny (kladně nabitými) díky obsahu D-alaninu v teichoových kyselinách buněčné stěny. U starších osob podporuje šíření bakterií pomalejší pohyb řasinek na epitelu a snížení frekvence produkce mucinu v důsledku stárnutí organismu (Brooks a Mias, 2018).

2.3. Původci otitis media

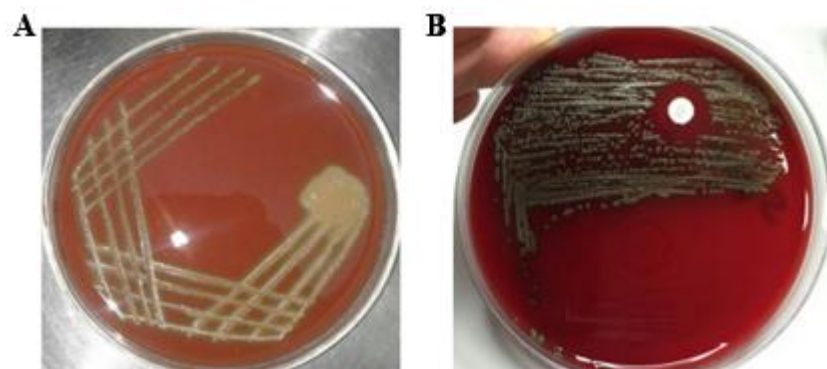
Mezi nejčastěji izolované bakteriální patogeny u zánětu středního ucha řadíme *Streptococcus pneumoniae*, netyfovateľné kmeny *Haemophilus influenzae* (NTHi) a *Moraxella catarrhalis*. Avšak chronický hnisavý zánět středního ucha mohou způsobit i *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* a *Pseudomonas aeruginosa*. S chronickou hnisavou formou jsou kromě těchto aerobních mikrobů spojovány i houby a anaerobní bakterie. Konkrétně se jedná o anaerobní Gram-pozitivní koky (např. *Peptococcus* spp. a *Prevotella melaninogenica*)

a Gram-negativní tyčinky (např. *Clostridium* spp., *Fusobacterium* spp. a *Bacterioides* spp.). Přestože tyto organismy izolujeme z klinických vzorků pacientů, mohou být i přirozenou součástí mikroflóry ucha (Mittal *et al.*, 2018).

2.3.1. *Streptococcus pneumoniae*

Bakterie *Streptococcus pneumoniae* jsou Gram-pozitivní mikroorganismy kolonizující sliznici nosohltanu a horních cest dýchacích. Jedná se o malé bakterie o velikosti přibližně 1 μm s mírně protáhlým kokoidním tvarem. Pneumokoky se většinou vyskytují v zapouzdřených nepohyblivých párech. Tyto bakterie způsobují 30 až 50 % (cca 300 milionů případů ročně) všech celosvětově hlášených případů *otitis media acuta*. Jedná se o hlavní patogeny recidivujících infekcí *otitis media*, ale také postinfekčních komplikací souvisejících např. se zavedením ventilační trubice. Mezi další závažná onemocnění způsobená těmito patogeny patří sinusitida, pneumonie, septikémie a meningitida (Bergenfelz a Hakansson, 2017; Leonard a Lalk, 2018). Perzistence těchto bakterií u různých hostitelů závisí na mnoha faktorech. Mezi tyto faktory patří např. exprese specifických faktorů virulence, systémy příjmu rozpoznávající živiny a bakteriální všestrannost přizpůsobit se různým fyziologickým podmínkám (Leonard a Lalk, 2018).

Pneumokoky jsou kataláza negativní, fakultativně anaerobní bakterie. Tyto bakterie jsou běžně kultivovány při 35 až 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂ na médiích s přidavkem beraní krve a mohou být kultivovány i na čokoládovém agaru (Mahato *et al.*, 2019). *Streptococcus pneumoniae* na těchto kultivačních médiích rostou v typických koloniích s knoflíkovým nebo mukoidním vzhledem (Sadowy a Hryniewicz, 2020). Na krevních agarových plotnách jejich kolonie vytváří charakteristickou zónu alfa-hemolýzy (Obrázek 6) (Leonard a Lalk, 2018).



Obrázek 6: Kolonie *Streptococcus pneumoniae* na krevním agaru (A – alfa-hemolýza; B – optochinový test) (upraveno dle Mahato *et al.*, 2019)

Klasická mikrobiologická identifikace *Streptococcus pneumoniae* zahrnuje testy na citlivost těchto mikroorganismů na optochin nebo na rozpustnost kolonií těchto patogenů v deoxycholátu sodném. Testování citlivosti na optochin slouží k odlišení *Streptococcus pneumoniae* od ostatních alfa-hemolytických streptokoků. K detekci pneumokoků molekulárními metodami je zásadní správný výběr vhodného cílového genu. Využívají se např. gen *ply* kódující pneumolysin a lokus *cps* polysacharidového pouzdra. Sérotypizace typu pouzdra patří mezi důležité kroky potvrzující identifikaci a charakterizaci kmene pneumokoků (Sadowy a Hryniewicz, 2020).

Hlavním faktorem virulence *Streptococcus pneumoniae* je polysacharidové pouzdro o šířce až 400 nm. Toto pouzdro tvoří největší část objemu buněk pneumokoků a ve většině případů je kovalentně připojené k zevnímu povrchu peptidoglykanu buněčné stěny bakterií. Pneumokoky inhibují pomocí polysacharidového pouzdra klasickou i alternativní cestu komplementu zamezením vazby imunoglobulinů, komplementárních složek a C-reaktivního proteinu na hlubší bakteriální povrchové struktury (Paton a Trappetti, 2019).

Pneumokoková pouzdra brání funkci tool-like receptorů nezbytných pro funkci ochranné imunity hostitele (De Vos *et al.*, 2015). Polysacharidová pouzdra pneumokoků také snižují opsonizaci (zvýšení účinnosti fagocytózy) a fyzicky narušují interakce mezi vázanými složkami komplementu nebo Fc oblastmi imunoglobulinů a příslušnými receptory na fagocytárních buňkách (Paton a Trappetti, 2019). Polysacharidová pouzdra tak pomocí těchto způsobů zajišťují ochranu bakterií proti fagocytóze a zabraňují zachycení *Streptococcus pneumoniae* v hlenu dýchacích cest. Kromě toho mohou polysacharidová pouzdra pneumokoků interferovat s vrozenými imunitními reakcemi hostitele maskováním několik ligandů spojených s buněčnou stěnou bakterií. Mezi tyto ligandy patří kyseliny lipoteichoová a lipopeptidy (De Vos *et al.*, 2015).

Prostup těchto bakterií do Eustachovy trubice je umožněn díky neuraminidázám štěpícím kyselinu N-acetylneuraminovou (kyselinu sialovou) z glykoproteinů a glykolipidů na povrchu eukaryotických buněk. Tyto enzymy mají schopnost štěpit také mucin, což snižuje odolnost bariéry a umožňuje bakteriím snadnější přístup k epitelu. Dochází také ke zpomalení ciliárního pohybu epiteliálních řasinek a zhoršení mechanismu samočištění ucha. Zánětlivá reakce je iniciována pneumolysinem a složkami buněčné stěny po prostoupení pneumokoků do středního ucha. Pneumolysin je silný toxin aktivující nekroptózu (programovaný způsob nekrózy). Tento proces začíná vazbou pneumolysinu k cholesterolu na povrchu hostitelských buněk.

Po této interakci vznikají oligomery vytvářejí póry s průměrem až 30 nm. Dále dochází k narušení komplementu a těsných spojení, což silně přispívá ke ztrátě sluchu v důsledku poškození kochleárního aparátu během *otitis media* (Brooks a Mias, 2018; Loughran *et al.*, 2019).

Buňky *Streptococcus pneumoniae* využívají také adhezivní faktory, a to fosforylcholin a protein vázající cholin A. Fosforylcholin se vyskytuje na povrchu buněčných stěn těchto patogenů a slouží jako místo pro vazbu proteinů vázající cholin (Loughran *et al.*, 2019). Cholin vázající protein je nekovalentně vázán na fosforylcholin kyseliny teichoové. Díky tomuto mechanismu jsou pneumokoky schopny kolonizovat dýchací cesty (Rosenow *et al.*, 2004). Pneumokoky postrádající cholin vázající protein se nemohou vázat na sliznici nosohltanu a mají sníženou schopnost kolonizovat dolní cesty dýchací a způsobovat i jiná onemocnění jako např. zápal plic (Loughran *et al.*, 2019).

Mezi další faktory virulence ovlivňující schopnost pneumokoků kolonizovat nosohltan patří sIgA1 proteázy. Enzymatickým rozštěpením Fc části imunoglobulinů typu A (IgA) převládajících na povrchu sliznic dochází k neutralizaci jejich aktivity a blokaci opsonizace. Zbývající fragmenty protilátek na povrchu buněčné stěny po proteolýze neutralizují negativní náboj polysacharidového pouzdra a zvyšují schopnost adherence (Brooks a Mias, 2018; Loughran *et al.*, 2019).

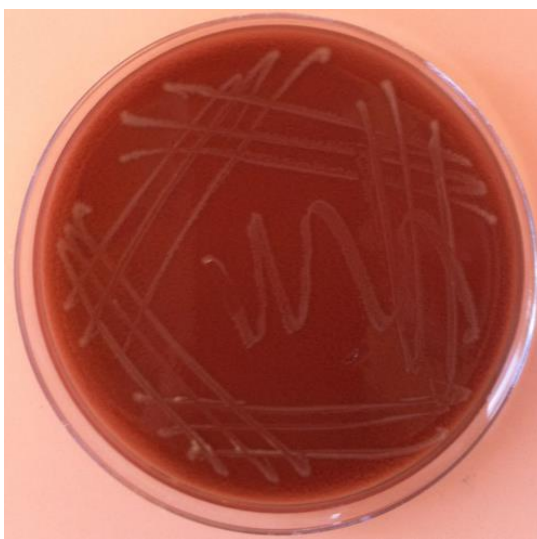
Schopnost tvořit bakteriální biofilmy patří také mezi faktory virulence těchto bakterií. Tvorbu biofilmů využívají k efektivní kolonizaci a perzistentnímu setrvání v nosohltanu či k unikání imunitním reakcím hostitele (Brooks a Mias, 2018). Disperze bakterií z biofilmů může být iniciována změnami mikroflóry, zánětem nebo virovou infekcí. Pneumokoky uvolněné do prostředí se v porovnání s biofilmovými bakteriemi fenotypicky liší a projevují zvýšenou schopnost šíření a vyvolání infekce (Loughran *et al.*, 2019).

2.3.2. *Haemophilus influenzae*

Bakterie *Haemophilus influenzae* jsou Gram-negativní kokobacily o velikosti přibližně 0,3 µm zahrnující opouzdržené (typovatelné) a neopouzdržené (netypovatelné) kmeny. Netypovatelné kmeny nemají polysacharidové pouzdro a jsou označovány jako NTHi (Non-Typeable *Haemophilus influenzae*) (Duell *et al.*, 2016). Poprvé byly tyto mikroorganismy identifikovány Pfeifferem v roce 1892. Tento vědec nesprávně identifikoval *Haemophilus influenzae* jako původce chřipky (King, 2012).

Buňky *Haemophilus* spp. mají specifické požadavky na růstové faktory X (hemin) nebo V (nikotinamid-adenindinukleotid) (Van Eldere *et al.*, 2014). Mezi infekce způsobené *Haemophilus influenzae* patří zánět středního ucha, sinusitida, konjunktivitida, bronchitida či pneumonie (Gönüllü *et al.*, 2021). Ve vzorcích z dutiny středního ucha byly tyto bakterie prokázány v 55 až 95 % případů, a to v závislosti na geografické poloze (Van Eldere *et al.*, 2014). Tyto otopatogeny se vyznačují kolonizací nosohltanu především zdravých dětí. U novorozenců nebo hostitelů s oslabenou imunitou se vzácně vyskytují invazivní infekce jako bakteriémie či meningitida (Gönüllü *et al.*, 2021). V poslední době hrají tyto bakterie stále větší roli v chronických zánětech dolních cest dýchacích (King, 2012).

Nejběžnějším kultivačním médiem používaným pro kultivaci *Haemophilus influenzae* je čokoládový agar doplněný o 5 % krve, zahřátý pro uvolnění nikotinamid-adenindinukleotidu a heminu (Obrázek 7). Alternativním kultivačním médiem je čokoládový agar doplněný bacitracinem. Bacitracin vykazuje inhibiční účinky vůči streptokokům, stafylokokům, *Neisseria* spp. a *Micrococcus* spp. často přítomných v komplexních polymikrobiálních oblastech těla jako je nosohltan (Harris *et al.*, 2017).



Obrázek 7: Kolonie *Haemophilus influenzae* na čokoládovém agaru (King, 2012)

Sérotypizace netypovatelných kmenů *Haemophilus influenzae* je obtížná z důvodu absence polysacharidového pouzdra. Tento faktor znemožňuje provedení běžné aglutinace pomocí specifických antisér (Romaneli *et al.*, 2019). Odlišení *Haemophilus influenzae* od NTHi kmenů je náročné, protože specifita metody PCR (polymerázové řetězové reakce) závisí na výběru

cílových genů. Aglutinační test je proto využíván pouze k rozlišení těchto dvou blízkých bakterií, ale ne k sérotypizaci. Gen proteinu vnější membrány NTHi kmenů označovaný *ompP6* je vysoce konzervovaná nukleotidová sekvence, a proto je využívána k PCR odlišení infekcí vyvolaných *Haemophilus influenzae* od jiných bakteriálních infekcí dýchacích cest (Fan *et al.*, 2018). Alternativní metodou detekce nukleových kyselin je izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkou. Tato metoda využívá jedinečný primární mechanismus poskytující specifické sekvence DNA v kratším časovém období oproti technice PCR (Takano *et al.*, 2017). Moderní molekulárně-biologické technologie umožňují preciznější rozlišení mezi typovatelnými a netypovatelnými kmeny pomocí identifikace genové oblasti označené jako lokus *cap*. Tato oblast genu odpovídá za kódování polysacharidové kapsidy hemofilů. Lokus *cap* se skládá ze tří oblastí, přičemž první a třetí oblast jsou společné pro všechny typy polysacharidové kapsidy a obsahují klíčové geny pro tvorbu, zpracování a transport kapsulárního materiálu na povrch buňky. Druhá oblast obsahuje geny specifické pro typy polysacharidových kapsid podílejících se na jejich biosyntéze. Kmeny s neúplným kapsulárním lokusem nejsou schopny efektivně exportovat polysacharid na povrch buňky a jsou tak považovány za netypovatelné pomocí běžných metod sérotypizace (Van Eldere *et al.*, 2014).

Netypovatelné kmeny *Haemophilus influenzae* uplatňují různé strategie úniku imunitním reakcím imunoglobulinů a faktorů komplementu hostitele. Z důvodu absence polysacharidového pouzdra nemají NTHi kmeny schopnost blokovat určitou vazbu vrozených imunitních faktorů. Tyto patogeny mohou navzdory absenci pouzdra vázat plazmatické proteiny a poté ovlivňovat hostitele prostřednictvím interakcí s lipooligosacharidy na svém bakteriálním povrchu. Tento děj zpomaluje nebo dokonce inhibuje kaskádu komplementu, což brání včasnému rozpoznání imunitním systémem hostitele (Duell *et al.*, 2016; Van Eldere *et al.*, 2014).

Produkce beta-laktamázy je dominantním mechanismem rezistence *Haemophilus influenzae* vůči beta-laktamovým antibiotikům. Beta-laktamázy identifikované u *Haemophilus influenzae* patří obvykle do třídy A serinových beta-laktamáz a jsou kódovány plazmidem. Konkrétně se jedná o beta-laktamázy ROB-1 a TEM-1 projevující schopnost hydrolyzovat beta-laktamový kruh. Tímto štěpením dochází k deaktivaci antibiotik a následné ztrátě jejich terapeutické účinnosti (Van Eldere *et al.*, 2014; Wen *et al.*, 2020). Enzymy beta-laktamázy jsou produkovány v cytoplasmě buněk ve formě prekurzorových molekul (pre-beta-laktamázy) obsahující N-terminální signální sekvenci. Tato signální sekvence v prekurzorech beta-laktamáz obsahuje specifické prvky umožňující interakci s buněčným sekrečním

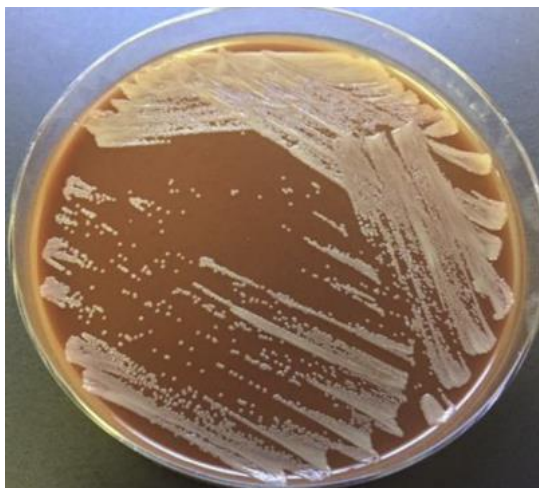
systémem. Existují dvě hlavní cesty pro přenos tohoto prekursoru z cytoplazmy do extracelulárního prostoru podle typu bakterií, a to systém obecné sekrece nebo dvojitě argininové translokační cesty. Systém obecné sekrece je komplexní mechanismus umožňující transport proteinů přes cytoplazmatickou membránu do periplazmy. Signální sekvence v prekurzorech beta-laktamáz s tímto systémem interagují a umožňují přenos prekursorů přes membránu. Avšak Gram-negativní bakterie jako jsou hemofily využívají pro transport prekursorů beta-laktamáz právě dvojitě argininové translokační cesty (Kaderabkova *et al.*, 2022). Umožňují tak *Haemophilus influenzae* odolávat účinkům široké škály beta-laktamových antibiotik včetně ampicilinu a aminopenicilinů (Van Eldere *et al.*, 2014; Wen *et al.*, 2020).

Netypovatelné kmeny *Haemophilus influenzae* jsou také schopny tvorby biofilmu ve středním uchu umožňující recidivu onemocnění nebo následnou infekci v pozdějším období (Duell *et al.*, 2016). Tvorba biofilmu částečně vysvětluje antibiotickou rezistenci těchto patogenů a recidivující, či chronickou povahu *otitis media* (Van Eldere *et al.*, 2014). Biofilm je v případě netypovatelných *Haemophilus influenzae* zodpovědný dále za bronchitidu, konjunktivitidu, sinusitidu, či zhoršení průběhu chronické obstrukční plicní nemoci (Novotny *et al.*, 2019). K tvorbě biofilmu přispívají především modifikátory struktury lipooligosacharidů na povrchu hemofilů. Pokud nejsou tyto modifikátory přítomny, schopnost tvořit biofilm je omezena. Netypovatelné *Haemophilus influenzae* využívají vytvořenou síť k zachycení a snížení baktericidní aktivity antimikrobiálního peptidu hostitele (Duell *et al.*, 2016).

2.3.3. *Moraxella catarrhalis*

Bakterie *Moraxella catarrhalis* jsou Gram-negativní neopouzdržené diplokoky. Tyto diplokoky jsou uspořádány do párů zploštělými přilehlými stranami. Roku 1984 byly tyto bakterie přerazeny z původního rodu *Branhamella* do rodu *Moraxella* (Verhaegh *et al.*, 2015). *Moraxella catarrhalis* jsou řazeny do skupiny humánních oportunních patogenů a jako komenzály nosohltanu patří mezi tři hlavní původce *otitis media*. Tyto bakterie představují potenciální etiologické agens především pro lidi se zvýšenou predispozicí k infekcím. *Moraxella catarrhalis* způsobuje celosvětově až 709 milionů případů *otitis media acuta* za rok, a to nejčastěji u dětí ve věku do čtyř let. Avšak mohou zapříčinit i pneumonie nebo bronchitidy u zdravých dospělých osob (Morris *et al.*, 2022; Verhaegh *et al.*, 2015). Bakterie *Moraxella catarrhalis* je často podceňovaný původce zánětu středního ucha, protože ve srovnání s ostatními původci *otitis media* vyvolává klinicky mírnější formy tohoto onemocnění (Perez a Murphy, 2017).

Na krevním agaru roste *Moraxella catarrhalis* v drobných, neprůhledných, šedobílých a nehemolytických koloniích. Růst kolonií této bakterie na čokoládovém agaru je zobrazen na Obrázku 8. Biochemicky jsou tyto bakterie oxidáza a kataláza pozitivní, redukují dusičnany a dusitany. Bakterie *Moraxella catarrhalis* jsou z biochemického pohledu asacharolytické (neschopné produkovat kyseliny ze sacharidů). Od jiných blízce příbuzných Gram-negativních koků lze tyto patogeny odlišit schopností hydrolyzovat tributyrin (Verhaegh *et al.*, 2015).



Obrázek 8: Kolonie *Moraxella catarrhalis* na čokoládovém agaru (upraveno dle Hirai *et al.*, 2016)

Na počátku infekce vyvolané těmito patogeny dochází k adhezi bakterií na slizniční epitel pomocí vazby se specifickými receptory hostitelských buněk. Po přichycení na epitel bakterie *Moraxella catarrhalis* kolonizují dýchací cesty a unikají imunitnímu systému hostitele. Imunitnímu systému hostitele tyto mikroby unikají vytvořením vazby s inhibičními faktory zabraňujícími složkám komplementu zneškodňovat patogenní bakterie. Pro přežití v náročných podmínkách konkurenční hostitelské bakteriální mikroflóry jsou využívány mechanismy pro řízení proteinové exprese prostřednictvím změn fázových změn (Verhaegh *et al.*, 2015).

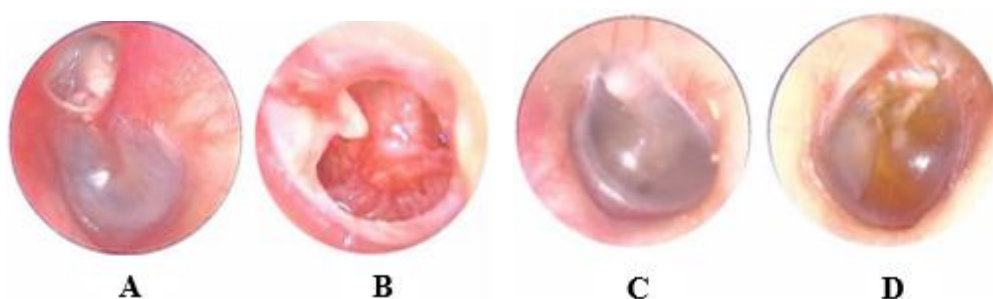
V důsledku produkce BRO beta-laktamáz jsou *Moraxella catarrhalis* odolné vůči antibiotikům s beta-laktamovým kruhem (amoxicilin) stejně jako netypovatelné kmeny *Haemophilus influenzae*. Tento faktor zapříčiňuje často problematickou terapii zánětu středního ucha, jelikož se jedná o tzv. antibiotika první volby. Enzymy zodpovědné za tuto rezistenci jsou dvě blízce příbuzné beta-laktamázy BRO-1 a BRO-2 (odvozeno od *Branhamella* a *Moraxella*) (Balder *et al.*, 2013; Verhaegh *et al.*, 2015).

Mezi další faktory virulence *Moraxella catarrhalis* jsou řazeny např. vnější membránové proteiny (UspA1, UspA2, UspA2H a MID/Hag). Membránové proteiny UspA1 a UspA2 se aktivně účastní procesu tvorby biofilmu, adheze k epitelovým buňkám a interakce s extracelulární maticí. Membránový protein UspA2H je považován za hybrid proteinů UspA1 a UspA2 a umožňuje bakteriím autoagregovat a odolávat účinkům komplementu. Vnější membránový protein MID/Hag plní funkci mediátoru hemaglutinace a neimunní vazby s imunoglobulinem D (IgD). Protein UspA společně s proteinem MID/Hag podléhá fázovým variacím přispívajícím k úniku před imunitním systémem hostitele (Blakeway *et al.*, 2019).

Tvorba biofilmu je důležitý faktor virulence *Moraxella catarrhalis* ovlivňující dobu a závažnost onemocnění. Bakterie jsou v biofilmech ve sníženém metabolickém stavu a mění své profily genové exprese, což taktéž přispívá ke zvýšené odolnosti vůči antibiotikům. Vzájemná spolupráce mezi *Moraxella catarrhalis* a dalšími otopatogeny zvyšuje během infekce růst a virulenci pneumokoků a kmenů NTHi (Perez a Murphy, 2017). Navíc mohou *Moraxella catarrhalis* poskytovat pneumokokům pasivní ochranu před účinky beta-laktamových antibiotik. Schopnost těchto bakterií tvořit polymikrobiální komunity se *Streptococcus pneumoniae* činí obě bakterie odolnějšími vůči procesu samočištění středního ucha, a to i pod tlakem antibiotik (Perez *et al.*, 2014).

2.4. Klinické formy *otitis media*

Zánět středního ucha je termín popisující několik forem onemocnění, mezi které patří akutní zánět středního ucha (AOM), chronický zánět středního ucha (COM), zánět středního ucha s výpotkem (OME) nebo chronický hnisavý zánět středního ucha (CSOM) (Schilder *et al.*, 2016). Klinické formy *otitis media* jsou zobrazeny na Obrázku 9.



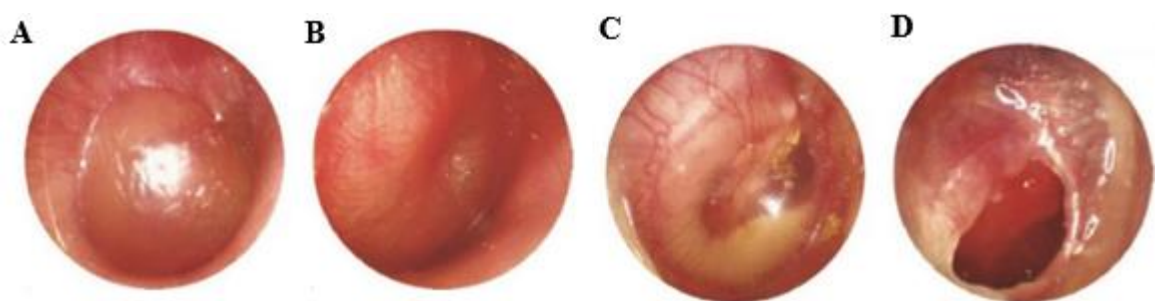
Obrázek 9: Endoskopický obraz tympanické membrány různých forem *otitis media* (A – akutní zánět středního ucha; B – zánět středního ucha s tvorbou cholesteatomu; C – fyziologická tympanická membrána; D – sekreční zánět středního ucha) (upraveno dle Zeng *et al.*, 2021)

Klasifikace *otitis media* je založena zejména na délce doby trvání onemocnění. Pokud onemocnění přetrvává dobu do 3 týdnů, jedná se o stav akutní. O subakutním stavu mluvíme, pokud onemocnění přetrvává delší dobu, ale současně daný stav nepřesahuje 3 měsíce (Jung *et al.*, 2021). Společné symptomy všech forem zánětu středního ucha zahrnují bolest ucha, horečku, ucpaný nos, pocit plnosti v uchu a tlumený sluch (Loughran *et al.*, 2019).

2.4.1. *Otitis media acuta*

Akutní zánět středního ucha je charakterizován patologickou reverzibilní (vratnou) přeměnou sliznice středního ucha spojenou s přítomností zánětlivých buněk. Během tohoto akutního stavu dochází i k hyperplazii sliznice. Po odeznění stimulace spojené se zánětem středního ucha se sliznice obnoví zpět do svého normálního stavu, jelikož dojde ke ztrátě schopnosti se dále diferenciovat (Jung *et al.*, 2021). Akutní forma *otitis media* navazuje na symptomatické virové infekce horních cest dýchacích způsobujících zánět sliznic těchto cest včetně nosohltanu a Eustachovy trubice (Paul a Moreno, 2020).

Samotné symptomy akutní formy *otitis media* (horečka, otalgie, podrážděnost, nespavost, výtok tekutiny z ucha, letargie, anorexie a zvracení) však postrádají citlivost a specifitu pro diagnostiku. *Otitis media acuta* je diagnostikován v případě středně závažného až závažného vyklenutí ušního bubínku nebo pokud nově vzniklý výtok není následkem sekundárního *otitis externa* (Qureishi *et al.*, 2014). Některé změny tympanické membrány při *otitis media acuta* jsou zobrazeny na Obrázku 10. U starších dětí se obvykle objevuje rychlý nástup bolesti ucha. U malých dětí neschopných verbální komunikace většinou pozorujeme tahání, tření, držení ucha, častý pláč, horečku, změny ve spánku nebo vzorci chování dítěte (Lieberthal *et al.*, 2013).



Obrázek 10: Typické otoskopické nálezy na tympanické membráně při *otitis media acuta* (A – bulózní formace membrány; B – zmohutnění membrány; C – přítomnost výpotku ze středního ucha; D – perforace membrány) (upraveno dle Hayashi *et al.*, 2020)

Diagnóza onemocnění může být stanovena i v případě výrazně červené, žluté nebo zakalené tympanické membrány. Hladina tlaku vzduchu a tekutiny za ušním bubínkem či dokonce jeho samotná perforace mohou také posílit pravděpodobnost diagnózy tohoto stavu *otitis media* (Venekamp *et al.*, 2017). Pneumatická otoskopie a tympanometrie jsou metody umožňující hodnocení stavu ušního bubínku a pokud vyšetření pomocí uvedených metod neprokáže přítomnost středoušního výpotku, diagnóza akutní otitidy je nepravděpodobná (Qureishi *et al.*, 2014). Akumulace tekutin v tympanické dutině může vyvolat zhoršení sluchu, zatímco nadměrná retence tekutin může být spojena s poruchami rovnováhy nebo vznikem závratí (Abdullah *et al.*, 2022).

Jedním z rizikových faktorů vzniku *otitis media acuta* může být např. zvýšená expozice dětí v kolektivech při docházce do školských zařízení. Děti jsou v kolektivech vystaveny zvýšenému riziku otopatogenní nazální kolonizaci patogeny způsobujícími virové infekce horních cest dýchacích, což usnadňuje taktéž patogenezi AOM. Expozice cigaretovému kouři je také považována za rizikový faktor pro AOM, především v prvním roce života dítěte. Často pozorujeme zvýšenou náchylnost k infekčním chorobám u chlapců, tedy i pohlaví je jedním z rizikových faktorů (Kaur *et al.*, 2017). Mezi další rizikové faktory patří život v přelidněných lokalitách či velkých rodinách, používání dudlíku, rhinorrhoea, či alergická nebo sezónní rýma. Genetické predispozice a historie předchozích případů *otitis media* jsou také považovány za rizikové faktory vzniku tohoto akutního onemocnění. Genetické faktory mají souvislost především s defekty ve vrozené imunitní odpovědi určitých jedinců. V těchto případech je ovlivněna produkce cytokinů a tento proces tak usnadňuje zánětlivou odpověď jedince. Tento rizikový faktor vede k opakovaným epizodám AOM (Hardani *et al.*, 2020; Jamal *et al.*, 2022).

Komplikace akutní formy *otitis media* se mohou rozvinout po nezhájené nebo nesprávné terapii. Mimo nevhodné postupy terapie mohou komplikace infekce způsobovat bakterie rezistentní na antibiotika, ale také další neznámé důvody. Výrazně tenké kostní struktury u dětí mohou být snadněji resorbovány infekcí. Také vrozené vývojové vady a anatomické či imunologické poměry mohou u některých jedinců zvýšit riziko výskytu komplikací. Jednou z komplikací *otitis media acuta* je akutní mastoiditida. Jedná se o hnisavou infekci vzduchových buněk v mastoidní kosti. Pokud se infekce středního ucha rozšíří do těchto kostních sklípků, dojde k otoku sliznice vnitřního ucha, lokální acidóze, ischemii, resorpci kosti a destrukci kostních mastoidních sept. Hypoxémie a metabolické změny vedou k selekci patogenů přežívajících v těchto podmínkách. Počáteční diagnóza této komplikace spočívá

především v klinických zobrazovacích metodách, a to počítačové tomografii nebo magnetické rezonanci (Laulajainen-Hongisto *et al.*, 2016). Počítačová tomografie se využívá zejména pro zobrazení kostních struktur, zatímco magnetická rezonance je častěji používána k hodnocení měkkých tkání a intrakraniálních struktur. Vyšetření počítačovou tomografií je rychlé, dostupné a vysoce kvalitní. Avšak využití magnetické rezonance vyžaduje delší čas na provedení a není k dispozici ve všech lékařských centrech (Sarno *et al.*, 2023). Další intratemporální komplikace jako je paréza lícního nervu a labyrintitida mohou nastat v případě šíření infekce středního ucha směrem k těmto strukturám. Tyto intratemporální komplikace mohou vést přes periosteitidu k dalším extratemporálním (např. absces zevního zvukovodu) nebo intrakraniálním (např. meningitida, intrakraniální absces) komplikacím (Laulajainen-Hongisto *et al.*, 2016).

Terapie akutního *otitis media* spočívá v symptomatické léčbě otalgie a horečky analgetiky jako je paracetamol a ibuprofen. Medikamentózní terapie dále zahrnuje použití lokálních antiseptik (Jamal *et al.*, 2022). Dávkování analgetik a antibiotik je stanoveno v závislosti na hmotnost pacienta. Antihistaminika a vasokonstriktory mohou pomoci s nosními alergiemi a ucpaným nosem, avšak neexistují důkazy o jejich přínosu pro rychlejší remisi nebo snižování komplikací tohoto onemocnění (McMahon Wicker a Labruzzo Mohundro, 2010). Mnoho případů akutní formy onemocnění středního ucha vymizí do 24 hodin dokonce bez léčby. Pokud pacient trpí pokročilou infekcí, jsou nezbytná perorální nebo systémová antibiotika (Kuo *et al.*, 2015). Antibiotika jsou vhodná u dětí mladších dvou let, u dětí s bilaterální akutní formou *otitis media* a u dětí s otorhoeou. Okamžitá antibiotická léčba se doporučuje u dětí s teplotami převyšujícími 37,5 °C, zvracením nebo s imunodeficiencí. U dětí starších dvou let běžný průběh terapie zahrnuje počáteční léčbu běžnými analgetiky a následný přechod na antibiotika obvykle po 3 až 4 dnech (Chan a Stephenson, 2023). Farmakologická léčba akutní formy *otitis media* využívá jednu nebo i více antimikrobiálních látek v kombinaci s hydrokortisonem, a to ve formě ušních kapek. Selhání tohoto způsobu léčby nastává v případě nedostatečného kontaktu léčiva s místem účinku v ušní dutině. Citlivost na antibiotika je stanovena pomocí kultivace středoušního výpotku získaného tympanocentézou. Amoxiciliny jsou beta-laktamová antibiotika odvozená od penicilinu. Jedná se o jedny z nejčastěji předepisovaných antibiotik po celém světě. Tato antibiotika vykazují vysokou účinnost vůči *Streptococcus pneumoniae* (Gibson a Veening, 2023; Jamal *et al.*, 2022). Amoxiciliny jsou využívány pro svůj baktericidní účinek spojený s vazbou na proteiny vázající penicilin (PBP). Tímto způsobem inhibují transpeptidaci, což je klíčový proces při syntéze buněčných stěn bakterií.

V kombinaci s kyselinou klavulanovou mají vynikající účinek i proti *Haemophilus influenzae* produkujícím beta-laktamázy či anaerobům produkujícím penicilinázy. Kyselina klavulanová působí jako ireverzibilní inhibitor beta-laktamáz způsobujících rezistenci vůči beta-laktamovému kruhu amoxicilinu (Gavrilovici *et al.*, 2022). Cefalosporiny vykazují v porovnání s amoxiciliny nebo cefalosporiny předchozích generací více vyrovnanou škálu účinnosti proti hlavním bakteriálním původcům *otitis media*. Tato antibiotika se využívají u jedinců trpících alergií na peniciliny. Funkce cefalosporinů spočívá v inhibici syntézy bakteriální buněčné stěny. *In vitro* studie naznačují, že tato antibiotika jsou účinná proti běžným Gram-pozitivním i Gram-negativním patogenům, což je činí vhodnou volbou pro empirickou terapii. Díky prodlouženému účinku a udržování stabilních koncentrací v tkáních je možné podávat tato léčiva dvakrát denně. Tyto faktory představují další výhodu oproti řadě jiných antibiotik s podobnou klinickou účinností (El-Shabrawi *et al.*, 2016; Gavrilovici *et al.*, 2022). Makrolidy se používají v případě je-li pacient alergický na peniciliny nebo cefalosporiny. Účinek těchto antibiotik spočívá v inhibici syntézy bakteriálních proteinů (Gavrilovici *et al.*, 2022; Jamal *et al.*, 2022).

Chirurgická léčba se při nekomplikované formě akutní *otitis media* běžně neaplikuje, ale pokud stav pacienta chirurgický zákrok vyžaduje, je provedena tympanocentéza (Chan a Stephenson, 2023). Tympanocentéza je procedura, při které se do středoušní dutiny zavede drobná jehla a následně je odsávána nahromaděná tekutina. Jedná o časově náročný proces, díky kterému se sníží tlak v dutině středního ucha. Jelikož jde o invazivní postup, je vyžadována zkušenost lékaře i zdravotní sestry. Tympanocentéza také zlepšuje dodávání antibiotik do infikované středoušní dutiny. Účinnost při léčbě *otitis media acuta* je však omezená a někdy je považována pouze za diagnostické opatření (Esposito *et al.*, 2021; Jamal *et al.*, 2022).

Prevenčí proti vzniku *otitis media acuta* je aplikace pneumokokové konjugované vakcíny Prevenar 13 nebo Prevenar 7. Kojení představuje další významný faktor v prevenci zánětu středního ucha, a to díky obsahu protilátek, antibakteriálních a protizánětlivých látek v mateřském mléce. Přijímáním mateřského mléka se zvyšuje hladina protilátek proti otopatogenům a dochází tak k zajištění optimálních nutričních hodnot a ke správnému vývoji Eustachovy trubice. Omezení expozice pasivnímu kouření také snižuje riziko vzniku akutního zánětu středního ucha (Castillo-Aguas *et al.*, 2023; Kaur *et al.*, 2017).

2.4.2. *Otitis media chronica*

Chronický zánět středního ucha je trvalá abnormalita tympanické membrány. Příčinou vzniku této formy onemocnění může být dlouhodobě přetrvávající podtlak ve středním uchu (Maharjan *et al.*, 2020). *Otitis media chronica* postihuje 2 až 3 % celosvětové populace (Choi *et al.*, 2012). Chronickou formu zánětu středního ucha lze rozdělit na chronický hnisavý zánět středního ucha (CSOM) a chronický zánět středního ucha s tvorbou cholesteatomu (OMC) (Jolink *et al.*, 2023).

Jedním z následků chronického zánětu středního ucha je ztráta sluchu. Faktory ovlivňující rozsah ztráty sluchu zahrnují velikost a místo perforace ušního bubínku či dobu trvání produkce výtoky ve středoušní dutině. Avšak existují jiné potenciálně život ohrožující komplikace jako je mozkový absces a paralýza lícního nervu. Zvláštním problémem je příchod pacientů k lékařům v pozdní fázi onemocnění, což vede k vyšší morbiditě a mortalitě (Maharjan *et al.*, 2020).

Rozšířené používání antibiotik snížilo výskyt COM a komplikací souvisejících s tímto onemocněním. Avšak hlavní terapeutickou strategií zůstává chirurgie, zejména u pacientů trpících zánětem středního ucha s tvorbou cholesteatomu (Choi *et al.*, 2012). U této formy zánětu středního ucha je chirurgický zákrok nutný (Jolink *et al.*, 2023). Hlavním účelem chirurgické léčby chronického zánětu středního ucha je odstranění patologické tkáně a obnovení normálních funkcí středního ucha (Choi *et al.*, 2012). Naproti tomu chronický hnisavý zánět středního ucha lze léčit zpravidla pomocí vhodné medikace a chirurgický zákrok se provádí pouze pokud onemocnění nelze zvládnout symptomaticky (Jolink *et al.*, 2023).

Cílem terapie chronické formy *otitis media* je vytvoření suchého, stabilního prostředí v uchu a také zachování normálního sluchu. Léčba je konzervativní nebo operativní (Chan a Stephenson, 2023). Jako operativní zákrok se využívají dvě techniky myringoplastiky, a to technika podložení (underlay) a technika překrytí (overlay) (Saraf *et al.*, 2022). Technika myringoplastiky je zvolena v závislosti na umístění perforace tympanické membrány (Sergi *et al.*, 2011). Technika „underlay“ je ideální pro reparaci malých a snadno viditelných perforací tympanické membrány. Provedení tohoto operativního zákroku je rychlé a snadné. Nevýhodou této techniky myringoplastiky je zmenšení prostoru středního ucha a špatná vaskularizace. Technika „overlay“ je náročnější a obvykle se používá při totálních perforacích, předních perforacích nebo po nesprávném provedení techniky „underlay“. Tympanická membrána je při tomto chirurgickém zákroku nahrazena novou neporušenou membránou a prostor středního ucha není v tomto případě omezen. Hlavní nevýhodou této techniky je delší doba regenerace

a pracnější provedení (Saraf *et al.*, 2022). Vysoká úspěšnost této techniky je ovlivněna omezenou chirurgickou manipulací středoušních struktur. Myringoplastika přispívá k prevenci opakovaných infekcí, ke zlepšení kvality života pacientů a umožňuje jim bezpečný kontakt s vodou. Pro dosažení optimálních výsledků je nezbytné, aby zkušený ušní chirurg měl dobré znalosti o technikách podložení i překrytí (Sergi *et al.*, 2011). Pokud je perforace ušního bubínku kombinovaná se sekundární infekcí a ztrátou sluchu, je tento chirurgický zákrok nezbytný (Jamal *et al.*, 2022).

2.4.3. *Otitis media chronica suppurativa*

Zánět středního ucha s tvorbou výpotku (séro-mukózní *otitis media*) je charakterizován přítomností tekutiny v dutinách středního ucha. Tato forma *otitis media* je chronická a nezpůsobuje perforaci tympanické membrány. Lokální zánět způsobuje hromadění výpotku v dutinách středního ucha a následnou metaplazii epitelu. Výpotek je obvykle hlenovitý, ale není hnisavý (Vanneste a Page, 2019). Nejběžnějšími bakteriemi způsobující CSOM jsou *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. a *Staphylococcus aureus*. Schopnost těchto zástupců tvořit biofilm přispívá k jejich četnosti v této formě *otitis media*. Zánět středního ucha s tvorbou výpotku se také často vyskytuje u jedinců s oslabenou imunitou (Chandra Sahu a Swain, 2019). *Otitis media chronica suppurativa* trvá nejméně tři měsíce, což ho odlišuje od přetrvávající přítomnosti výpotku po *otitis media acuta* (Vanneste a Page, 2019). Nejvyšší incidence je u dětí ve věku od tří do devíti let (Colella-Santos *et al.*, 2019). Chronický hnisavý zánět středního ucha je obvykle komplikací perzistujícího AOM, ale rizikové faktory tohoto stavu se v různých podmínkách liší. Za vznik CSOM jsou často zodpovědné časté infekce horních cest dýchacích a špatné socioekonomické podmínky (přelidněné domácnosti, špatná hygiena či výživa jedince) (Morris, 2013).

Jedním z následků *otitis media chronica suppurativa* může být převodní ztráta sluchu nebo sensorineurální ztráta sluchu. Převodní ztráta sluchu vzniká jako důsledek překážky v šíření zvukových vln ze středního ucha do vnitřního ucha (Mittal *et al.*, 2015). Rozsah ztráty sluchu závisí pouze na objemu výpotku. Vztah mezi viskozitou výpotku a dobou po kterou byl ve středním uchu přítomen není jednoznačný (Wiederhold *et al.*, 1980). Bylo prokázáno, že stupeň poškození sluchu je přímo úměrný poškození struktur středního ucha. Ztrátu sluchu lze připisovat nevratným tkáňovým změnám ve sluchové šterbině. Sensorineurální ztráta sluchu může vzniknout poškozením kochley nebo poškozením nervových drah přenášejících signály z vnitřního ucha do mozku (Mittal *et al.*, 2015). Kochleární dysfunkce může být příčinou

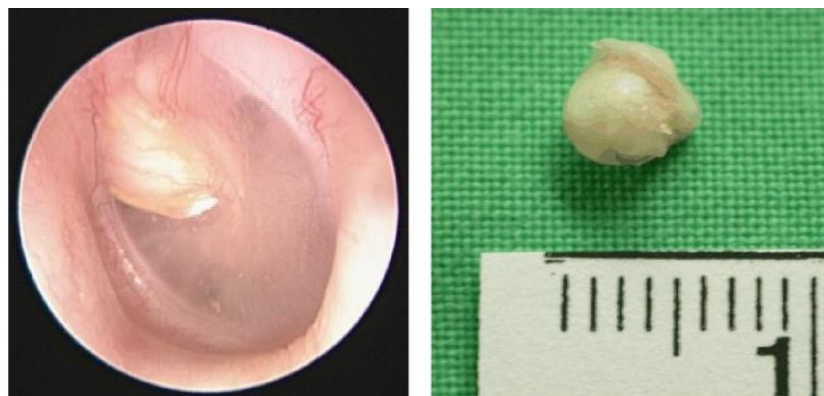
V otorinolaryngologickém kontextu je zavedení tympanostomické trubice charakterizované jako malý a snadný chirurgický zákrok vyžadující celkovou nebo lokální anestezii. Tympanostomické trubice byly poprvé použity na konci 19. století a v roce 1954 byly vylepšeny plastickými materiály. Od té doby došlo k mnoha dalším inovacím materiálů používaných pro výrobu a design těchto trubic (Nagar a Deshmukh, 2022). U starších dětí a dospělých pacientů se tympanostomické trubice obvykle zavádějí v ordinaci otolaryngologa za použití lokálních anestetik jako je např. fenol. Podávání anestetik není vhodné u malých dětí (Lustig *et al.*, 2020). Po zavedení zůstává tympanostomická trubice v ušní membráně po dobu 6 až 12 měsíců, jindy zůstávají *in situ* po dobu 24 měsíců nebo déle. Čím déle zůstane ventilační trubice *in situ*, tím vyšší je riziko následných komplikací (Chan a Stephenson, 2023). Nicméně většina potenciálních komplikací spojených s touto operací se obvykle považuje za přijatelné. Jednou z významnějších komplikací spojených se zavedením tympanostomické trubice je otorrhea (výtok tekutiny ze středoušní dutiny) odtékající do vnějšího ucha. K této drenáži může dojít bezprostředně po operaci nebo o několik týdnů později. Vzácnou asymptomatickou komplikací může být migrace tympanostomické trubice ze svého umístění ve zvukovodu za ušní membránu (Jamal *et al.*, 2022).

2.4.4. *Otitis media chronica suppurativa epitympanalis*

Chronická forma zánětu středního ucha může být spojena s vyšší rychlostí proliferace keratinocytů nebo zvýšenou mírou růstových faktorů přítomných v dětství. Následkem těchto faktorů dochází ke vzniku cholesteatomu (patologické struktury). Cholesteatom je z histologického hlediska benigní, cystická léze vyrůstající z epitelu tympanické membrány do středního ucha a mastoidu. Tato forma *otitis media* bývá u dětí destruktivnější a má vyšší sklon k recidivě (Jolink *et al.*, 2023; Luers a Hüttenbrink, 2016). Vytvoření cholesteatomu ve středním uchu vede k aktivaci cytokinů (interleukin-1, interleukin-6, interleukin-17 nebo interferon-beta) podporujících zánětlivou kostní resorpci. Může tak docházet k výrazné zánětlivé reakci. Mezi klinické příznaky *otitis media chronica suppurativa epitympanalis* patří zápachající otorrhea se sklonem k recidivě. Narušeným pohybem ušních kůstek a poškozením kochley může dojít k sensorineurální ztrátě sluchu či k jiným sluchovým komplikacím jako je např. tinnitus. Destrukce kosti v oblasti ucha může také vyvolat dysfunkci rovnováhy jedince. Pokud dojde k porušení kanálku lícního nervu, dochází k dočasné nebo trvalé paralýze obličeje (Kuo *et al.*, 2015). Ke vzniku *otitis media* s tvorbou cholesteatomu může dojít také přechodem z formy *otitis media* s tvorbou výpotku.

Přítomný výpotek u *otitis media chronica suppurativa* je zpočátku serózní a postupně dochází k histologickým změnám na sliznici středního ucha. Tyto změny zahrnují zvětšení pohárkových buněk a hlenových žláz. Výpotek středního ucha se tak postupně mění nejprve na sero-mukózní, následně na mukoidní a nakonec na hustý až vláknitý. Na původně nedotčené tympanické membráně se začnou objevovat trofické změny vedoucí ke komplikovanější formě onemocnění (Zernotti *et al.*, 2017).

Cholesteatom dělíme na dva typy podle patogeneze onemocnění středního ucha, a to na vrozený a získaný. Cholesteatom vrozeného původu (Obrázek 12) je tvořen dlaždicovým epitelem umístěným za neporušenou tympanickou membránou a je častější u dětí. Tato forma není spojena s historií předchozích případů *otitis media* nebo otologických operací. Získaná forma cholesteatomu postihující děti i dospělé je lokalizovaná pouze ve středním uchu a dělí se dále na primární a sekundární. U primárního typu získané formy cholesteatomu dochází k vtažení části tympanické membrány do středního ucha v důsledku vzniklého podtlaku. V případě sekundární formy cholesteatom vzniká naopak z migrujícího dlaždicového epitelu do středního ucha skrz perforovaný ušní bubínek, což může být způsobeno infekcí, traumatem nebo nesprávným chirurgickým zákrokem (Kuo *et al.*, 2015). Vzhledem k lokalizaci biofilmů na sliznici mastoidního výběžku ve středním uchu vznikají ideální podmínky pro patogenezi cholesteatomu. V takových případech *otitis media* se doporučuje tympanoplastika (Tong *et al.*, 2015; Vestby *et al.*, 2020).



Obrázek 12: Vrozená forma cholesteatomu středního ucha (upraveno dle Kuo *et al.*, 2015)

Terapie zánětu středního ucha s tvorbou cholesteatomu zahrnuje především chirurgické zákroky. Aplikace antibioticko-steroidních kapek je nezbytná u pacientů s projevy akutní infekce, avšak není schopna zajistit úplné odstranění získaného cholesteatomu (Chan a Stephenson, 2023). Medikamentózní terapie se využívá pouze pro kontrolu předoperační infekce a ke snížení rizika pooperačních komplikací (Kuo *et al.*, 2015). Základem léčby zánětu středního ucha s tvorbou cholesteatomu je chirurgické odstranění patologického ložiska s využitím mikroskopických a endoskopických metod. Cílem je eradikovat onemocnění a zabránit jeho recidivě. Konkrétně se jedná o Canal wall down mastoidektomii (CWD) a Canal wall up (CWU) (Fassone *et al.*, 2023). Cílem CWD je vytvoření dutiny propojující zvukovod a mastoid. Technika CWD mastoidektomie zahrnuje odstranění zadní kostěné stěny dutiny středního ucha a zúžení prostoru za ušním bubínkem. Tento zákrok zabraňuje vtažení tympanické membrány do středního ucha a redukuje povrch sliznice. Vznik dalšího cholesteatomu je tak výrazně omezen. Chirurgové využívají CWD mastoidektomii v případě masivní formy cholesteatomu nebo pro revizní operace ucha (Fassone *et al.*, 2023; Kuo *et al.*, 2015). Mezi předoperační indikace k technice CWD patří revizní operace, rozsáhlé poškození nebo pokud se jedná o pacienty s velkým anestetickým rizikem (např. senioři) (Karamitsou *et al.*, 2023). Chirurgická technika CWD vede k nižší četnosti recidivy vzniku. Hlášené recidivující formy tohoto onemocnění se pohybují pouze mezi 4 a 17 % (Fassone *et al.*, 2023; Karamitsou *et al.*, 2023). Častými následky těchto operací středního ucha bývá nesnášenlivost vody a nerovnováha pacienta. K nerovnováze dochází působením vody nebo vzduchu na barometrické receptory ve středním uchu. Navíc anatomické změny v ušní dutině a otorrhoea způsobují u pacientů s částečnou ztrátou sluchu problémy s nošením sluchadel (Fassone *et al.*, 2023). Volba chirurgického postupu tak může silně ovlivnit sluchové výsledky a následky operativního zákroku. Pokud předoperační vyšetření odhalí velké množství mastoidních buněk vyplněných vzduchem, je preferována technika CWU. V rámci metody CWU mastoidektomie dochází ke kompletnímu odstranění mastoidních vzduchových buněk za současného udržení nedotčené anatomické struktury zvukovodu (Kuo *et al.*, 2015). U pediatrických pacientů je vhodnější provedení CWU kvůli omezené toleranci čištění mastoidní dutiny a vyššímu procentu úspěšnosti zlepšení funkce středního ucha s postupem věku. Hlavní výhodou techniky CWU je lepší hojení, zachování samočisticí schopnosti zevního zvukovodu, lepší tolerance vody a snadnější nasazení sluchadel. Výsledky sluchu u pacientů podstupujících CWD jsou oproti sluchu pacientů po operaci CWU obvykle horší kvůli zasažení do zvukové rezonance ve středním uchu (Karamitsou *et al.*, 2023).

U dětí postižených zánětem středního ucha se získanou formou cholesteatomu je nutno dodržovat zvláštní pozornost, jelikož u těchto pacientů má onemocnění složitější rysy. Spánková kost u dětí je charakterizována dobře pneumatizovanými rozsáhlými vzduchovými buňkami. Tyto buňky poskytují dostatečný prostor umožňující šíření onemocnění a agresivní projev cholesteatomu ve středním uchu. Nevčasná diagnóza nebo terapie onemocnění středního ucha s tvorbou cholesteatomu může mít velký vliv na vývoj jazyka a učební výkon dítěte. Včasný chirurgický zákrok zvyšuje šanci na zachování nebo dokonce obnovení sluchu pacienta (Kuo *et al.*, 2015).

2.4.5. Perzistující a recidivující *otitis media*

Biofilmy jsou často identifikovány jako faktor přispívající k mnoha případům chronické nebo recidivující formy *otitis media*, což představuje příspěvek k celkové morbiditě spojené s tímto onemocněním (Perez a Murphy, 2017). Bakterie jako *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae* mají schopnost uvolňovat vyšší množství eDNA do extracelulární biofilmové matrice, což podporuje bakteriální adhezi a soudržnost biofilmu. Následkem těchto mechanismů vzniká biofilmová perzistence (Tikhomirova a Kidd, 2013). Následkem nadměrného užívání systémových antibiotik akutní formy *otitis media* dochází k přemnožení a šíření potenciálních patogenů v nosohltanu. Snadno tak vzniká problematika s antibiotickou rezistencí. Dokonce bylo zjištěno, že tvorba biofilmu probíhá rychleji u pacientů léčených antibiotiky ve srovnání s pacienty využívajícími jinou možnost terapie (Te Molder *et al.*, 2016).

Recidivující stav *otitis media* u dítěte je definován, pokud se objeví nejméně 3 epizody akutního zánětu středního ucha v období 6. měsíců nebo 4 a více epizod během 12. měsíců. Prvním opatřením při podezření na rekurentní formu onemocnění středního ucha je ověření diagnózy, aby bylo možné zamezit nadměrné zátěži pacienta terapií antibiotiky nebo chirurgickým zákrokem (Granath, 2017). Recidivující *otitis media chronica suppurativa* je způsobena jedním nebo kombinací několika faktorů. Tyto faktory zahrnují nedodržování léčebného plánu či infekce způsobené rezistentními bakteriemi vůči antibiotikům. Mezi tyto rezistentní bakterie patří např. *Pseudomonas aeruginosa* nebo methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Mittal *et al.*, 2015). Zavedením ventilační trubice u této formy onemocnění dochází k odstraňování výpotku, ale ne k odstraňování bakteriálního biofilmu. U této formy *otitis media* se zavádí nové léčebné strategie založené na eradikaci biofilmu dodáváním antibiotik do místa infekce. Toto lokální podávání antibiotik přímo do ušní dutiny je v porovnání s podáváním systémových antibiotik velice účinné. Lokální podávání antibiotik

je bezpečnější s ohledem na riziko systémové toxicity. Avšak nevýhodou podávání léčiv přímo do středoušní dutiny je potřeba naříznout nebo propíchnout tympanickou membránu. Existují dvě strategie podávání antibiotických látek, a to transtympanické a intratympanické podávání. Transtympanické podávání spoléhá na možnost difundování terapeutických molekul přes tympanickou membránu ze zvukovodu do středního ucha, což může být usnadněno použitím chemických zesilovačů permeace. Avšak v současné době není tato technika v klinické praxi běžná. Druhým způsobem podávání antibiotik do místa působení je transtympanické podávání ve formě magnetických částic. Opět se nejedná o klinicky používanou léčebnou metodu (Qureishi *et al.*, 2014). Přítomnost cholesteatomu ve středním uchu je dalším rizikovým faktorem recidivy onemocnění (Mittal *et al.*, 2015).

2.5. Diagnostika otitis media a původců onemocnění

Identifikace infekčních agens zahrnuje v současných klinických podmínkách odběr ušního výtěru a následnou mikrobiologickou analýzu. Gramovo barvení však neposkytuje specifické informace o dané bakterii, což může vést k nesprávným léčebným postupům (Prasad *et al.*, 2020). Hlavní bakteriální otopatogeny *Streptococcus pneumoniae* a netypovatelné *Haemophilus influenzae* patří navíc ke kultivačně náročným mikroorganismům se zvláštními požadavky (Yatsyshina *et al.*, 2016). Snížená metabolická aktivita u bakterií ve formě biofilmů ztěžuje spolehlivost metod detekce založených na kultivaci, jelikož jsou tyto postupy primárně navrženy pro identifikaci planktonních bakterií (Perez a Murphy, 2017). Odběr a následná kultivace výpotku středního ucha se nazývá tympanocentéza. Jedná se o referenční metodu diagnostiky onemocnění umožňující zhodnotit a charakterizovat výpotek. Tato metoda je hlavním ukazatelem pro výběr správných antibiotik (Esposito *et al.*, 2021). Kvalita kultivace výpotku závisí především na životaschopnosti mikroorganismů, má omezenou citlivost a je pracná i časově náročná (Yatsyshina *et al.*, 2016). Každá identifikace patogenů proto vyžaduje kromě základních mikrobiologických technik také postupy molekulárně-biologické (analýza DNA, RNA, či proteinů). Specifická DNA či RNA patogenů je přesněji detekována metodou PCR. Ačkoli jsou tyto techniky užitečné, mezi hlavní nevýhody patří nutnost využití specializovaného vybavení a vysoce kvalifikovaného laboratorního personálu. Příprava vzorků pro tuto metodu je časově náročná (Prasad *et al.*, 2020).

Diagnostika onemocnění a určení příslušných stádií nemoci vyžaduje také vyšetření tympanické membrány pomocí otoskopie, otomikroskopie, či metodou videootoskopie se statickými snímky nebo nahrávkami (Lundberg *et al.*, 2014). Pro doplnění otoskopie je

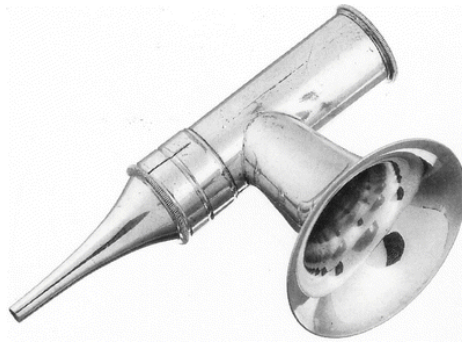
využívána tympanometrie, pneumatická otoskopie a akustická reflektometrie (Harmes *et al.*, 2013). Možnosti ušního vyšetření prošly mnoha historickými změnami od ušních a hlavových zrcadel přes ruční otoskopy, až po moderní binokulární mikroskopy a endoskopy (Bassiouni *et al.*, 2022). Pediatri a praktičtí lékaři používají pro diagnostiku onemocnění středního ucha ruční otoskopy. Otolaryngologové a otologové využívají navíc binokulární mikroskopy a endoskopy. Otologové preferují také otomikroskopy pro jejich vyšší citlivost a specifitu (Lundberg *et al.*, 2014; Bassiouni *et al.*, 2022).

2.5.1. Otoskopie

Otoskopie je důležitým a nezbytným nástrojem pro diagnostiku onemocnění středního a vnějšího ucha (*otitis media* a *otitis externa*), zvukovodu a tympanické membrány. Diagnostika *otitis media* se provádí na základě přímého pozorování vzhledu bubínku a středoušní dutiny za použití ručního otoskopu a musí se kombinovat i s klinickými projevy pacienta (Chen *et al.*, 2022; Méndez, 2016). Otoskop je monokulární optický přístroj s nízkou intenzitou světla a trychtýřovitým nástavcem poskytujícím pouze dvourozměrný pohled na zvukovod. Ruční otoskop neumožňuje hodnocení pohyblivosti bubínku. Vizualizace ušního bubínku může být obtížná z důvodu nedostačeného osvětlení nebo přítomností velkého množství ušního mazu ve zvukovodu (Esposito *et al.*, 2021; Méndez, 2016).

Dříve se vyšetření uší provádělo přímým pozorováním zvukovodu za denního světla a vyšetření tak byla omezena na dobu dne, kdy bylo dostatečně jasné denní světlo. Navíc bylo potřebné zařízení pro zlepšení přístupu ke zvukovodu. Toto zařízení muselo udržovat zvukovod otevřený a poskytovat přímé osvětlení uvnitř ucha. Z tohoto důvodu se v průběhu let začalo pro vyšetření uší používat spekulum a ušní zrcadlo. Spekulum je zařízení kónického tvaru a bezpečně se vkládá do ušní dutiny (Méndez, 2016). Ušní zrcadlo poprvé popsal německý lékař Friedrich Hofmann. Dalším otologům umožnil objev ušního zrcadla podrobně popsat onemocnění středního ucha. Například Von Troltsch přesně popsal myringitidu, akutní zánět středního ucha s perforací membrány, traumatickou perforaci bubínku a zlomeniny spánkové kosti právě pomocí těchto nástrojů (Isaacson, 2023). Dalším významným požadavkem byla účinná metoda směřování koncentrovaného přirozeného denního světla do hloubky zvukovodu. Tohoto požadavku bylo dosaženo použitím perforovaného zrcátka nainstalovaného na rukojeť nebo na hlavu zařízení a došlo tak k eliminaci stínových efektů. Další příspěvek pro kvalitnější vyšetření zavedl Von Troltsch připevněním tohoto zrcadla na čelo lékaře (Méndez, 2016). Bruntonovo zařízení poprvé popsané v roce 1865 bylo dalším vylepšením diagnostických

metod onemocnění uší. Tento auriskop spojoval zrcadlo a spekulum do jediného nástroje a fungoval na principu periskopu. Světlo ze svíčky nebo lampy se koncentrovalo trychtýřem a následně se odráženo rovinným zrcadlem nastaveným pod úhlem 45° do zvukovodu. Zrcadlo mělo středový otvor, skrz který mohl lékař pozorovat ucho. Bruntonův auriskop (Obrázek 13) byl vybaven zvětšovací čočkou a na osvětlovacím konci byl uzavřen obyčejným sklem (Méndez, 2016). Až na přelomu 20. století byla zkonstruována řada elektrických otoskopů. Peter T. Geyerman z Brewsteru v Minnesotě vymyslel v roce 1904 kompaktní uzavřený otoskop (Isaacson, 2023).



Obrázek 13: Bruntonův auriskop (Méndez, 2016)

Konstrukce moderního ručního otoskopu (Obrázek 14) se skládá se z rukojeti a hlavice. Rukojeť je dlouhá a má reliéfní povrch pro snadné uchopení. Součástí rukojeti je také baterie k napájení integrovaného světla. Součástí hlavice je zvětšovací čočka na okuláru s typickým zvětšením 8 dioptrií, jednorázové plastové zrcátko kuželovitého tvaru a integrovaný zdroj světla. Jako zdroj integrovaného světla se využívá žárovka, LED dioda nebo optické vlákno. Při vyšetření zvukovodu lékař vloží do otoskopu jednorázové zrcátko a tahem za ucho narovná zvukovod pacienta pro snadnější zavedení otoskopu. Otoskopy se používají i ke screeningu onemocnění během pravidelných kontrol (Méndez, 2016).

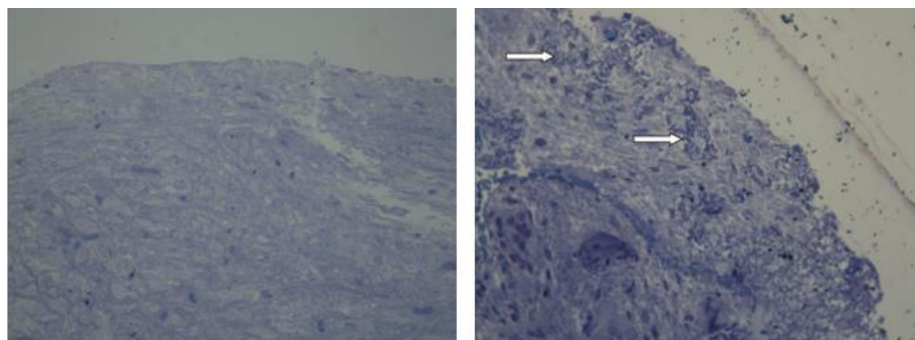


Obrázek 14: Ruční otoskop (upraveno dle Méndez, 2016)

U pediatrických pacientů je častokrát umožněn pouze krátký pohled na zvukovod a ušní bubínek. V tomto případě poskytuje vyšetřujícímu lékaři zvětšený a detailní obraz videootoskopický záznam přehrávaný na velké obrazovce. Navíc tato metoda umožňuje opakované prohlížení záznamů ve zpomaleném režimu, či postupném zobrazování jednotlivých snímků. Poskytuje tak lepší příležitost k důkladnému studiu ušního bubínku (Lundberg *et al.*, 2014). Otoskop je cenným nástrojem nejen pro detekci ušních problémů, ale i k dermatologické kontrole, vyšetření oka, nosu nebo krku (Méndez, 2016). Při diagnostice zánětu středního ucha s výpotkem má samotná otoskopie nízkou citlivost a specifitu (61 %). Z tohoto důvodu se pro vyšetření této formy *otitis media* využívá spíše otomikroskopie (Sundvall *et al.*, 2019).

2.5.2. Otomikroskopie

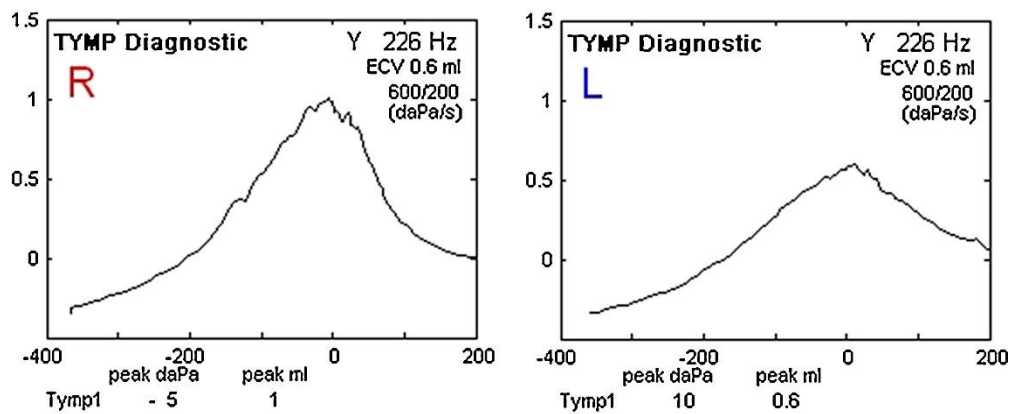
Otomikroskopie je považována za „zlatý standard“ otologického vyšetření. Její výhody zahrnují větší zvětšení, vynikající vnímání hloubky a možnosti provádět výkony s nástroji přes optickou čočku i oběma rukama (Sundvall *et al.*, 2019). Jedná se o diagnostickou metodu za použití binokulárního mikroskopu ve spojení s větším kovovým ušním zrcátkem. Při tomto vyšetření má pacientem vleže zakloněnou hlavu, což poskytuje mnohem větší zorné pole a vnímání hloubky zvukovodu v trojrozměrné struktuře. Mikroskop disponuje velkým zvětšením umožňujícím detailnější pohled celého zvukovodu a tympanické membrány (Méndez, 2016). Otomikroskopie je preferovaná vyšetřovací technika na otolaryngologických klinikách i operačních sálech. V porovnání s otoskopií vykazuje otomikroskopie při diagnostice *otitis media chronica suppurativa* vyšší citlivost (87 až 91 %) a specifitu (89 až 93 %) (Sundvall *et al.*, 2019). Na obrázku 15 je zobrazena mikroskopická vizualizace touto diagnostickou technikou.



Obrázek 15: Otomikroskopie tvorby biofilmu obarveného toluidinovou modří (upraveno dle Akyıldız *et al.*, 2013)

2.5.3. Tympanometrie

Tympanometrie se využívá primárně pro diagnostiku zánětu středního ucha u dětí starších šesti měsíců. Tato metoda hodnotí pohyblivost tympanické membrány pomocí odrazu zvuku. Pokud se výpotek akumuluje ve středním uchu, dojde ke snížené pohyblivosti ušního bubínku a lze pozorovat vyklenutí na ušní membráně (Ahamed *et al.*, 2016; Qureishi *et al.*, 2014). Abnormální tlaky mohou poskytnout časný signál o rozvíjejícím se *otitis media*. Přítomnost výpotku je zobrazena na tympanogramu plochou linií. Po včasném zahájení léčby se tympanogram mění od plochého zpět k normálnímu vrcholu (Parlea *et al.*, 2012). Tympanogram je zobrazen na Obrázku 16. Vysoce negativní tlaky ve středním uchu ukazují na stažený bubínek a vysoce pozitivní špičkové tlaky indikují vyklenutou tympanickou membránu (Ramakrishnan *et al.*, 2007).



Obrázek 16: Tympanogramy pravého (R) a levého (L) ucha kojence trpícího *otitis media chronica suppurativa* (upraveno dle Park *et al.*, 2015)

Tympanometr je neinvazivní, ruční zařízení poskytující objektivní, kvantitativní a grafické informace o potenciální přítomnosti středoušního výpotku. Toto zařízení využívá k záznamu poddajnosti bubínku a stavu středního ucha elektroakustický impedanční můstek. Tympanometrické výsledky jsou snadno interpretovatelné a mají dobrou diagnostickou spolehlivost pro vyloučení, či potvrzení přítomnosti výpotku (Erkkola-Anttinen *et al.*, 2014; Klein, 2000). Míra senzitivity a specificity detekce středoušní tekutiny dosahuje 70 až 90 %. Nevýhodou této techniky je závislost na spolupráci pacienta (Harmes *et al.*, 2013).

2.5.4. Pneumatická otoskopie

Pneumatický otoskop poprvé představil lékař Siegle v roce 1864. Tento lékař ho využíval pro získání lepších informací o pohyblivosti tympanické membrány zejména u špatně spolupracujících pacientů (Hayoung *et al.*, 2022). Pneumatická otoskopie je v klinické praxi nejspolehlivější metodou pro diagnostiku *otitis media*. Tato diagnostická metoda využívá osvětlení viditelným světlem a posuzuje pohyblivost bubínku (Kashani *et al.*, 2021). Ruční pneumatický otoskop představuje kombinaci standardního otoskopu s tlakovou baňkou vytvářející změny tlaku vzduchu. Před vyšetřením je proto nutné vytvořit pevné a vzduchotěsné spojení mezi otoskopem a ušním kanálem pacienta pomocí specializovaného ušního zrcátka s pryžovými kroužky. Tlak vzduchu v ušním kanálu musí být dostatečně velký, aby bylo možné otoskopicky zviditelnit pohyb ušního bubínku. Zároveň musí být tlak dostatečně bezpečný a zamezující poškození tympanické membrány. Tlak vzduchu z pneumatické baňky by měl poskytovat podtlak i přetlak, aby bylo možné obousměrně pohybovat s ušním bubínkem (Kashani *et al.*, 2021; Won *et al.*, 2020). Provedení pneumatické otoskopie je zobrazeno na Obrázku 17.



Obrázek 17: Provedení pneumatické otoskopie (upraveno dle Kenneth, 2018)

Standardní provedení pneumatické otoskopie je obtížné a zahrnuje několik úkonů najednou. Nejprve musí lékař uchytit baňku insuflátoru a otoskop, dále musí bezpečně manipulovat s hlavou a ušním boltcem pacienta a v neposlední řadě musí střídavě stlačovat a uvolňovat vzduch pomocí insuflátoru. Všechny tyto úkony musí být provedeny při zachování těsnění mezi zrcátkem a zevním zvukovodem (Kenneth, 2018). Pneumatická otoskopie má velký potenciál, jelikož zvětšení pohybu identifikuje a vizualizuje pohyby pouhým okem neviditelné.

Využívá se především pro diagnostiku *otitis media chronica suppurativa*, protože v přítomnosti výpotku je pohyblivost ušního bubínku výrazně omezena. Pneumatická otoskopie je často popisována jako obtížně proveditelná a z toho důvodu se v praxi používá jen zřídka. Přesnost této diagnostické metody závisí výhradně na individuálních dovednostech vyšetřujícího lékaře (Kashani *et al.*, 2021; Won *et al.*, 2020). Připojením pneumatického otoskopu k endoskopu a videokameře za účelem zaznamenání videa pneumatické otoskopie mohou lékaři sdílet své nálezy na obrazovce a zaznamenávat dynamické pohyby membrány (Hayoung *et al.*, 2022).

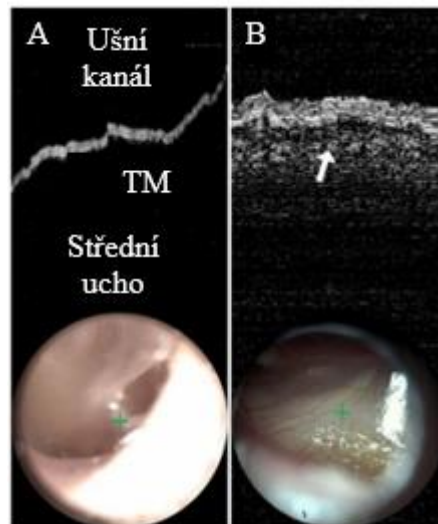
2.5.5. Akustická reflektometrie

Metoda akustické reflektometrie byla poprvé použita v roce 1984 za účelem zdokonalení diagnostiky *otitis media* s tvorbou výpotku, zejména u pediatrických pacientů. Diagnostiku onemocnění pomocí této metody lze provádět u pediatrických pacientů od věku čtyř let. Avšak je vyžadována spolupráce dítěte, což představuje značnou nevýhodu. Akustická reflektometrie posuzuje pravděpodobnost *otitis media* s tvorbou výpotku prostřednictvím měření reakce tympanické membrány na zvuk emitovaný lehkým přenosným zařízením. Tato metoda oproti pneumatické otoskopii nevyžaduje vzduchotěsné spojení mezi přístrojem a zvukovodem pacienta. Jedná se o velmi užitečnou diagnostickou metodu pro hodnocení a screening onemocnění, neboť její provedení je snadné a rychlé (Lee *et al.*, 2014; Muderris *et al.*, 2013). Výsledky akustické reflektometrie musí být korelovány i s klinickým vyšetřením pacienta (Harmes *et al.*, 2013). Akustická reflektometrie umožňuje navíc měření úrovně sluchu, které není možné stanovit pouze jednoduchou pneumatickou otoskopií či tympanometrií (Lee *et al.*, 2014).

2.5.6. Optická koherentní tomografie

Optická koherentní tomografie je neinvazivní optická zobrazovací technika založená na interferometru. Pomocí této metody dochází k vizualizaci tympanické membrány a středního ucha s cílem identifikovat patologické stavy. Tato technika umožňuje zobrazování biologických struktur *in vivo* s vysokým rozlišením pomocí měření časového zpoždění echa či velikosti a fáze zpětně rozptýleného světla. Je považována za optickou analogii ultrazvuku využívající infračervené světlo k vytváření hloubkově rozlišených obrazů s rozlišením v mikronovém měřítku. Optická koherentní tomografie může poskytnout kvantitativní strukturální informace o tympanické membráně. Mezi tyto informace patří měření tloušťky tympanické membrány, stanovení přítomnosti a rozsahu biofilmu ve středním uchu či stanovení

přítomnosti a opticko-mechanických vlastností výpotku středního ucha (Dsouza *et al.*, 2018). Poskytuje vizualizaci podpovrchové struktury cílové oblasti v reálném čase a využívá se především k diferenciaci cholesteatomu od zanícené sliznice (Seong *et al.*, 2022). Od svého zavedení na počátku 80. let 20. století je pro určení přítomnosti cholesteatomu důležitou diagnostickou technikou nepostradatelnou při plánování operace. Před operací by měly být opakovaně provedeny skeny ušní dutiny pro identifikaci rozsahu onemocnění, možné destrukce kosti či anatomických abnormalit (Kuo *et al.*, 2015). V případě recidivujícího onemocnění by měly být pomocí tomografie zobrazeny spánkové kosti, aby bylo možné vyhodnotit potenciální tvorbu cholesteatomu nebo mastoidního abscesu. Při včasném odhalení těchto patologických struktur je onemocnění stále chirurgicky korigovatelné (Mittal *et al.*, 2015). Na Obrázku 18 je zobrazen záznam této diagnostické techniky.



Obrázek 18: Snímky tympanické membrány (TM) pomocí optické koherentní tomografie (A – fyziologický stav; B – *otitis media acuta*) (upraveno dle Teague a Nolan, 2023)

4. PREVENCE VZNIKU *OTITIS MEDIA*

Cílem prevence je snížit výskyt *otitis media* a zabránit závažným komplikacím tohoto onemocnění – např. zápal plic, sepse, meningitida či jiné invazivní formy pneumokokové infekce (Zahid *et al.*, 2024). Na základě specifického složení polysacharidového pouzdra (hlavní faktor virulence bakterií) bylo identifikováno přes 100 sérotypů *Streptococcus pneumoniae*. Avšak každý z těchto sérotypů vykazuje potenciál k vyvolání onemocnění. Většina případů *otitis media* po celém světě je obvykle spojena s několika konkrétními sérotypy (Chapman *et al.*, 2024). Jako preventivní opatření proti vzniku tohoto onemocnění vyvolaného pneumokoky byly vyvinuty 2 typy tzv. pneumokokových vakcín, a to vakcíny polysacharidové a konjugované (Zahid *et al.*, 2024). Očkování proti pneumokokům je v současné době doporučováno dospělým jedincům s rizikovými faktory výskytu vážných komplikací po infekci a dětem do dvou let. Dále je očkování vhodné pro jedince s chronickým poškozením některých orgánů (např. srdeční selhání, chronická respirační onemocnění nebo imunosuprimovaný imunitní systém jedince). Do kategorie imunokompromitovaných jedinců patří např. jednotlivci s primární a sekundární imunodeficiencí (Segundo a Condino-Neto, 2021).

Primární imunodeficiencie je zodpovědná nejen za zvýšenou náchylnost k infekčním onemocněním, ale rovněž zvyšuje predispozici k alergiím, malignitám, autoimunitním a autozánětlivým stavům. V poslední době se termín primární imunodeficiencie stále více nahrazuje pojmem „vrozená porucha imunity“ (Segundo a Condino-Neto, 2021). Osoby s primární imunodeficiencí jsou vystaveny riziku pneumokokové infekce v důsledku genetického defektu v imunitním systému (Froneman *et al.*, 2021). Většina poruch primární imunodeficiencie způsobuje změny v základních imunitních procesech, čímž se zvyšuje náchylnost k infekci vyvolané běžnými i oportunními patogeny. Vrožené poruchy imunity mají také souvislost se změnami v regulaci imunitního systému (Segundo a Condino-Neto, 2021). Současné doporučení pro vakcinaci těchto osob je jedna dávka pneumokokové konjugované vakcíny Prevenar 13 a následná pneumokoková polysacharidová vakcína Pneumovax 23 po uplynutí alespoň 2 měsíců. Očkování proti pneumokokům je pro tyto pacienty považováno za bezpečné, jelikož vakcíny neobsahují živé mikroorganismy (Froneman *et al.*, 2021).

Sekundární imunodeficiencie nastává v případě, pokud je imunitní systém jedince narušen vnějšími faktory. Mezi tyto vnější faktory se řadí např. infekční onemocnění, malignity, imunosupresivní terapie a závažné environmentální podmínky (Froneman *et al.*, 2021).

Pokud jsou pediatričtí pacienti trpící sekundární imunodeficiencí očkováni, je jejich imunogenita srovnatelná s imunogenitou zdravých vrstevníků. S postupem času však dochází k postupnému snižování imunitní odpovědi. Pokud nedojde k opakovanému přeočkování, zůstávají tito pacienti ohroženi rozvojem infekce. Z tohoto důvodu je důležité pravidelně monitorovat minimální hladiny protilátek u těchto jedinců. Pokud imunitní odpověď klesne pod úroveň poskytující dostatečnou ochranu, měly by být těmto dětem podávány posilovací dávky vakcíny (Esposito *et al.*, 2015). Pokud jedinec trpí sekundární imunodeficiencí je doporučena pneumokoková konjugovaná vakcína Prevenar 13. Tato vakcína prokazuje vysokou imunogenitu, což vede k vytvoření vyšších hladin protilátek a k rozvoji větší imunologické paměti. Pokud po podání této pneumokokové konjugované vakcíny není zaznamenána adekvátní protilátková odpověď, doporučuje se dále podání pneumokokové polysacharidové vakcíny Pneumovax 23 (Froneman *et al.*, 2021).

4.1.1. Pneumokokové polysacharidové vakcíny

Roku 1977 byla udělena licence první pneumokokové vakcíně v USA. Jednalo se o 14-valentní nekonjugovanou purifikovanou pneumokokovou polysacharidovou vakcínu. V roce 1983 tuto vakcínu následovala 23-valentní vakcína stejného typu (Thong *et al.*, 2023). Pneumokokové polysacharidové vakcíny obsahují polysacharidy reprezentující 23 sérotypů *Streptococcus pneumoniae* (Zahid *et al.*, 2024). Tyto vakcíny jsou dostupné ve formě jednorázových injekčních lahviček o objemu 0,5 ml nebo lahviček o více dávkách o objemu 5 ml. Vakcíny se aplikují intramuskulárně nebo subkutánně do deltového svalu nebo laterálně do poloviny stehna. Mezi běžné nežádoucí účinky vakcín patří mírné reakce, jako je otok a bolest v místě vpichu, bolest hlavy a celková únava (Daniels *et al.*, 2016). Antigeny ve formě polysacharidů nevyvolávají aktivitu T-buněk a nevytvářejí dlouhodobou paměť B-buněk. B-buňky se vyskytují v peritoneálních a pleurálních tělesných dutinách, ale mohou být taktéž nalezeny v kostech a ve slezině, kde konstitutivně produkují přirozený imunoglobulin M (IgM). Protilátky tvořené B-buňkami hrají klíčovou roli v eliminaci apoptických buněk a toxických metabolitů z oběhového systému. Kromě toho rychle reagují na infekce, jsou tak primární obranou proti mikrobiálním patogenům (Jaufmann *et al.*, 2021). Povrchové polysacharidové antigeny však nepřipravují imunitní systém na opakovanou reakci po další expozici. U kojenců s nejvyšším rizikem invazivních pneumokokových onemocnění jsou tyto vakcíny málo imunogenní. Z tohoto důvodu byla vyvinuta technologie konjugace vakcín (Naus, 2023).

4.1.2. Pneumokokové konjugované vakcíny

Ke schválení používání první pneumokokové konjugované vakcíny došlo v roce 2000 (Thong *et al.*, 2023). Konjugace pneumokokové vakcíny spočívá v připojení polysacharidu k proteinovému nosiči, čímž se dosáhne reakce závislé na T-buňkách a indukuje se paměť B-buněk. V důsledku těchto inovací získaly pneumokokové konjugované vakcíny velkou popularitu (Naus, 2023). Konjugovaná varianta vakcín vede k účinnější a dlouhodobější imunitní odpovědi. První licencovaná 7-valentní konjugovaná pneumokoková vakcína využívala jako nosný protein netoxickou variantu difterického toxinu. Postupně byly do různých formulací pneumokokových vakcín začleněny různé nosné proteiny nebo proteinové komplexy jako např. difterický a tetanový toxoid, proteinový komplex vnější membrány meningokoka, či protein D *Haemophilus influenzae* (Thong *et al.*, 2023). Přestože jsou tyto vakcíny účinné proti vzniku *otitis media*, jejich riziko stále spočívá v proměnlivosti sérotypů patogenů způsobujících toto onemocnění. Pokud patogeny vyznačují odlišný sérotyp, vakcína není účinná. Pneumokokové 7-valentní konjugované vakcíny byly postupně nahrazeny novými typy, a to 10- a 13-valentními konjugovanými vakcínami (Moraes *et al.*, 2020; Zahid *et al.*, 2024). Pneumokokové konjugované vakcíny byly přidány do základní série očkování dětí ve 2., 4. a 6. měsíci s posilovací dávkou ve 12. až 15. měsíci života (Schilder *et al.*, 2016). Po zavedení vakcín pneumokokové konjugované vakcíny Prevenar 7 a Prevenar 13 došlo ke snížení množství případů *otitis media*, což ukazuje na důležitost těchto vakcín, a především na imunizaci proti pneumokokům v raném věku života (Ioannidis *et al.*, 2023). V současnosti jsou k dispozici komerčně dostupné konjugované vakcíny Prevenar 13 a Prevenar 20. Tyto typy vakcín jsou konjugovány s extracelulárním proteinem *Corynebacterium diphtheriae* (Zahid *et al.*, 2024).

4.1.3. Vakcíny proti *Haemophilus influenzae* a *Moraxella catarrhalis*

Zavedení vakcín proti netypovatelným kmenům *Haemophilus influenzae* vedlo ke změnám v distribuci těchto patogenů způsobujících *otitis media*. Netypovatelné *Haemophilus influenzae* jsou jednou z nejčastějších příčin akutních a recidivujících zánětů středního ucha, a to z důvodu schopnosti vytvářet biofilm v nosohltanu. Pneumokokové konjugované vakcíny s nosným protein D a 7-valentní pneumokokové konjugované vakcíny proti *Haemophilus influenzae* nevykazují rozdílný vliv na kolonizaci nosohltanu. Genetická rozmanitost mezi kmeny NTHi má za následek sekvenční heterogenitu mnoha povrchových antigenů a vakcíny proti tomuto

patogenu jsou tak aktivní oblastí výzkumu. Ochranu populace před *Haemophilus influenzae* i před pneumokoky představuje 10-valentní konjugovaná vakcína (Murphy, 2015).

Vakcíny proti *Moraxella catarrhalis* jsou prevencí díky schopnosti snižovat mikrobiální kolonizaci nosohltanu, blokovat migraci potencionálních patogenů do středního ucha a do dolních cest dýchacích, či inhibovat růst bakterií v těchto oblastech dýchací soustavy (Perez a Murphy, 2017). Avšak u dětí vakcinovaných přímo v průběhu nemoci, *Moraxella catarrhalis* vykazuje ve srovnání s obdobím před zavedením pneumokokové konjugované vakcíny dokonce zvýšenou četnost na sliznici nosohltanu (Murphy, 2009). Podání vakcíny proti *Moraxella catarrhalis* napomáhá odstraňování kopatogenů poskytujících možnou pasivní rezistenci vůči antibiotikům a vakcinace tak zvyšuje i efektivitu antimikrobiální léčby *otitis media* (Perez a Murphy, 2017).

5. ZÁVĚR

Bakteriální biofilm je složitým jevem mikrobiologie a hraje klíčovou roli v patogenezi mnoha infekčních onemocnění, včetně *otitis media*. V této práci byly popsány základní informace o struktuře bakteriálního biofilmu, procesu jeho tvorby včetně metod detekce. Strukturální a metabolické změny v biofilmové komunitě vytvářejí prostředí odolné vůči účinkům mnoha látek včetně antibiotik. Bakterie uvnitř biofilmů jsou chráněny před účinky těchto látek, což je častým důvodem neúčinné standardní terapie. Tento problém má značný dopad na klinickou praxi, protože způsobuje komplikace při léčbě infekcí spojených s biofilmy a může vést k chronickým a recidivujícím onemocněním. Infekce spojené s tvorbou biofilmů mohou být obtížně léčitelné a vyžadují přístup zohledňující charakteristické znaky biofilmových struktur a jejich interakce s hostitelským prostředím.

Zánět středního ucha se může projevovat v různých klinických formách, z nichž má každá specifické charakteristiky a příznaky. *Otitis media acuta* je nejběžnější formou tohoto onemocnění a obvykle je způsoben bakteriální nebo virovou infekcí. *Otitis media chronica* může být spojen s opakujícími se infekcemi nebo přetrvávajícími symptomy, jako je výtok z ucha, ztráta sluchu nebo chronická bolest. Perzistující a recidivující *otitis media* představují závažný problém v klinické praxi, zejména v souvislosti s nadměrným užíváním antibiotik a tvorbou bakteriálních biofilmů. Pochopení jednotlivých forem *otitis media* je klíčové pro správnou diagnostiku a terapie těchto infekcí.

Diagnostika *otitis media* a identifikace hlavních původců tohoto onemocnění, a to včetně analýzy jejich faktorů virulence, pomáhá v klinické praxi lépe porozumět průběhu infekce. Diagnostické metody jako je např. otoskopie, otomikroskopie, tympanometrie či pneumatické otoskopie umožňují lékařům detailně vyšetřit stav ucha, posoudit přítomnost tekutiny nebo hnisu a identifikovat příznaky *otitis media*.

Prevence vzniku *otitis media* je důležitým cílem v oblasti zdravotnictví, zejména u dětí nejvíce náchylných k této infekci. Vývoj vakcín proti hlavním patogenům zodpovědných za vznik zánětu středního ucha byl klíčovým pokrokem v ochraně zdraví populace a snižování výskytu komplikací spojených s tímto onemocněním.

Závěrem lze říct, že do budoucna by mělo být cílem zredukovat nadměrné užívání antibiotik v terapii mnoha onemocnění, neboť dochází k postupnému rozvoji rezistentních kmenů a zvyšuje se množství perzistentních infekcí. Důležitým směrem pro budoucí výzkum je také

další zkoumání mechanismů tvorby biofilmů a identifikace nových terapeutických cílů pro léčbu biofilmem asociovaných infekcí. Zároveň by lékaři by měli mít dostatečné znalosti a dovednosti v používání diagnostických technik *otitis media*. Přesná interpretace výsledků těchto metod a správné posouzení stavu ucha jsou totiž klíčové pro úspěšnou identifikaci *otitis media* a vhodnou terapii. Z tohoto důvodu je nezbytné pravidelně školit lékaře a poskytovat jim informace o nových metodách diagnostiky *otitis media* a o metodách detekce bakteriálního biofilmu. Celkově je důležité zlepšit strategie prevence a léčby *otitis media* s cílem minimalizovat negativní dopady této choroby na zdraví jednotlivců a snížit zátěž zdravotnických systémů.

POUŽITÁ LITERATURA

1. **Abdel-Razek O., Audlin J., Poe D.S., Wang G.** (2022) Surfactant proteins and innate immunity of *otitis media*. *Innate Immunity*. 28(7–8): 213–223. ISSN 17534259.
2. **Abdullah J., Abdulla A., Mohammad T., Safar A.** (2022) Etiology, diagnosis, complications, and management of acute *otitis media* in children. *Cureus*. 14(8): e28019. ISSN 21688184.
3. **Ahamed A. A., Krishnamoorthy K.** (2016) *Otitis media* in children: A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 8(8): 844–849. ISSN 09751459.
4. **Akyildiz I., Take G., Uygur K., Kizil Y., Aydil U.** (2013) Bacterial biofilm formation in the middle-ear mucosa of chronic *otitis media* patients. *Indian Journal of Otolaryngology & Head and Neck Surgery*. 65(S3): 557–561. ISSN 22313796.
5. **Alves-Barroco C., Paquete-Ferreira J., Santos-Silva T., Fernandes A. R.** (2020) Singularities of pyogenic streptococcal biofilms – from formation to health implication. *Frontiers in Microbiology*. 11: 584947. ISSN 1664302X.
6. **Anju V. T., Busi S., Imchen M., Kumavath R., Mohan M. S., Salim S. A., Subhaswaraj P., Dyavaiah M.** (2022) Polymicrobial infections and biofilms: clinical significance and eradication strategies. *Antibiotics*. 11(12): 1731. ISSN 20796382.
7. **Ansari M. A., Khan H. M., Khan A. A., Cameotra S. S., Pal R.** (2014) Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles against biofilm of extended spectrum β -lactamase isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Nanoscience*. 4(7): 859–868. ISSN 21905509.
8. **Balder R., Shaffer T. L., Lafontaine E. R.** (2013) *Moraxella catarrhalis* uses a twin-arginine translocation system to secrete the β -lactamase BRO-2. *BMC Microbiology*. (13)1: 140. ISSN 14712180.
9. **Banerjee D., Shivapriya P. M., Gautam P. K., Misra K., Sahoo A. K., Samanta S. K.** (2020) A review on basic biology of bacterial biofilm infections and their treatments by nanotechnology-based approaches. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 90(2): 243–259. ISSN 22501746.
10. **Bassiouni M., Ahmed D. G., Zabaneh S. I., Dommerich S., Olze H., Arens P., Stölzel K.** (2022) Endoscopic ear examination improves self-reported confidence in ear examination skills among undergraduate medical students compared with handheld otoscopy. *GMS Journal for Medical Education*. 39(1): Doc3. ISSN 23665017.

11. **Bergenfelz C., Hakansson A. P.** (2017) *Streptococcus pneumoniae* otitis media pathogenesis and how it informs our understanding of vaccine strategies. *Current Otorhinolaryngology Reports*. 5(2): 115–124. ISSN 2167583X.
12. **Bertolini M., Costa R. C., Barão V. A. R., Cunha Villar C., Retamal-Valdes B., Feres M., Silva Souza J. G.** (2022) Oral microorganisms and biofilms: new insights to defeat the main etiologic factor of oral diseases. *Microorganisms*. 10(12): 2413. ISSN 20762607.
13. **Blakeway L. V., Tan A., Peak I. R. A., Seib K. L.** (2019) Virulence determinants of *Moraxella catarrhalis*: distribution and considerations for vaccine development. *Microbiology*. 163(10): 1371–1384. ISSN 13500872.
14. **Brooks L. R. K., Mias G. I.** (2018) *Streptococcus pneumoniae*'s virulence and host immunity: aging, diagnostics, and prevention. *Frontiers in Immunology*. 9: 1366. ISSN 16643224.
15. **Castillo-Aguas G., García-Vera C., Urkin J., Moretto M., Spreitzer M. V., Keronen P., Werner A., Reali L., Geitmann K., Poloskey P., Kartousova B., Werner S., Schumacher M., Reingold S., Sánchez-Pina C.** (2023) *Acute otitis media* management: A survey of european primary care pediatricians. *Global Pediatrics*. (4): 100057. ISSN 26670097.
16. **Ciofu O., Rojo-Molinero E., Macià M. D., Oliver A.** (2017) Antibiotic treatment of biofilm infections. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*. 125(4): 304–319. ISSN 09034641.
17. **Colella-Santos M., Donadon C., Milaine D. S., Leticia R. B.** (2019) *Otitis media*: Long-term effect on central auditory nervous system. *BioMed Research International*. e2314–e6141. ISSN 23146133.
18. **Daniels C. C., Rogers P. D., Shelton C. M.** (2016) A review of pneumococcal vaccines: current polysaccharide vaccine recommendations and future protein antigens. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*. 21(1): 27–35. ISSN 15516776.
19. **De Vos A. F., Dessing M. C., Lammers A. J., Porto A. P., Florquin S., De Boer O. J., De Beer R., Terpstra S., Bootsma H. J., Hermans P. W., Van 't Veer C., Van Der Poll T.** (2015) The polysaccharide capsule of *Streptococcus pneumoniae* partially impedes MyD88-mediated immunity during pneumonia in mice. 10(2): e0118181. ISSN 19326203.

20. **Di Domenico E. G., Oliva A., Gueembe M.** (2022) The current knowledge on the pathogenesis of tissue and medical device-related biofilm infections. *Microorganisms*. 10(7): 1259. ISSN 20762607.
21. **Dsouza R., Won J., Monroy G. L., Hill M. C., Porter R. G., Novak M. A., Boppart S. A.** (2018) *In vivo* detection of nanometer-scale structural changes of the human tympanic membrane in *otitis media*. *Scientific Reports*. 8(1): 8777. ISSN 20452322.
22. **Duell B. L., Su Y. C., Riesbeck K.** (2016) Host-pathogen interactions of nontypeable *Haemophilus influenzae*: from commensal to pathogen. *FEBS Letter*. 590(21): 3840–3853. ISSN 00145793.
23. **Ekdale E. G.** (2016) Form and function of the mammalian inner ear. *Journal of Anatomy*. 228(2): 324–337. ISSN 00218782.
24. **El-Shabrawi M. H., Tolba O. A., El-Adly T. Z.** (2016) Efficacy and safety of cefpodoxime in the treatment of acute *otitis media* in children. *Egyptian Pediatric Association Gazette*. 64(2): 81–85. ISSN 11106638.
25. **Erkkola-Anttinen N., Tähtinen P. A., Laine M. K., Ruohola A.** (2014) Parental role in the diagnostics of *otitis media*: Can parents be taught to use tympanometry reliably? *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 78(7): 1036–1039. ISSN 01655876.
26. **Esposito S., Bianchini S., Argentiero A., Gobbi R., Vicini C.** (2021) New approaches and technologies to improve accuracy of acute *otitis media* diagnosis. *Diagnostics*. 11(12): 2392. ISSN 20754418.
27. **Esposito S., Prada E., Lelii M., Castellazzi L.** (2015) Immunization of children with secondary immunodeficiency. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 11(11): 2564–70. ISSN 21645515.
28. **Fan X., Liu X., Ji L., Cai D., Jiang J., Zhu J., Sun A., Yan J.** (2018) Epidemiological analysis and rapid detection by one-step multiplex PCR assay of *Haemophilus influenzae* in children with respiratory tract infections in Zhejiang Province, China. *BMC Infectious Diseases*. 18(1): 414. ISSN 14712334.
29. **Fassone E., Fabiano B., Caracciolo A., Sapino S., Ferrero V.** (2023) Use of bonalive in obliterative mastoidectomy: anatomical results and clinical outcome. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 280(8): 3577–3583. ISSN 09374477.
30. **Fireman P.** (1997) *Otitis media* and eustachian tube dysfunction: Connection to allergic rhinitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 99(2): 787–797. ISSN 00916749.

31. **Froneman C., Kelleher P., José R. J.** (2021) Pneumococcal vaccination in immunocompromised hosts: an update. *Vaccines*. 9(6): 536. ISSN 2076393X.
32. **Gavrilovici C., Spoială E.-L., Miron I.-C., Stârcea I. M., Halițchi C. O. I., Zetu I. N, Lupu V. V., Pânzaru C.** (2022) Acute *otitis media* in children – challenges of antibiotic resistance in the post-vaccination era. *Microorganisms*. 10(8): 1598. ISSN 20762607.
33. **Ghai I.** (2023) A barrier to entry: examining the bacterial outer membrane and antibiotic resistance. *Applied Sciences*. 13(7): 4238. ISSN 20763417.
34. **Gibson P. S., Veening J.-W.** (2023) Gaps in the wall: understanding cell wall biology to tackle amoxicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Current Opinion in Microbiology*. 72: 102261. ISSN 13695274.
35. **Gönüllü E., Özkan N., Soysal A., Acioğlu E., Tavil E. B., Ötğün S. N., Karaböcüoğlu M.** (2021) Nontypeable *Haemophilus influenzae otitis media*: Mastoiditis and meningitis complicated with central venous thrombosis in an immunocompetent child. *Case Reports in Infectious Diseases*. 2021: 1–5. ISSN 20906633.
36. **Granath A.** (2017) Recurrent acute *otitis media*: What are the options for treatment and prevention? *Current Otorhinolaryngology Reports*. 5(2): 93–100. ISSN 2167583X.
37. **Hardani A., Esfandabadi M. F., Delphi M., Samir M. A., Abdollahi F. Z.** (2020) Risk factors for *otitis media* in children referred to abuzar hospital in Ahvaz: A case-control study. *Cureus*. 12(8): e9766. ISSN 21688184.
38. **Harmes K. M., Blackwood R. A., Burrows H. L., Cooke J. M., Harrison R. V., Passamani, P. P.** (2013) *Otitis media*: diagnosis and treatment. *American Family Physician*. 88(7): 435–440. ISSN 15320650.
39. **Harris T. M., Rumaseb A., Beissbarth J., Barzi F., Leach A. J., Smith-Vaughan H. C.** (2017) Culture of non-typeable *Haemophilus influenzae* from the nasopharynx: not all media are equal. *Journal of Microbiological Methods*. 137: 3–5. ISSN 01677012.
40. **Hayashi T., Kitamura K., Hashimoto S., Hotomi M., Kojima H., Kudo F., Maruyama Y., Sawada S., Taiji H., Takahashi G., Takahashi H., Uno Y., Yano H.** (2020) Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of acute *otitis media* in children–2018 update. *Auris Nasus Larynx*. 47(4): 493–526. ISSN 03858146.
41. **Hayoung B., Chae Jung P., Seong Je O., Myung Jin C., Baek Hwan C., Yang-Sun C.** (2022) Automatic prediction of conductive hearing loss using video pneumatic otoscopy and deep learning algorithm. *Ear and Hearing*. 43(5): 1563–1573. ISSN 15384667.

42. **Head D., Marsh P. D., Devine D., Tenuta L. M. A.** (2023) *In silico* study of hyposalivation and sugar exposure on biofilm dysbiosis. *JADA Foundational Science*. 2: 100019. ISSN 2772414X.
43. **Hirai J., Kinjo T., Tome T., Hagihara M., Sakanashi D., Nakamura H., Haranaga S., Mikamo H., Fujita J.** (2016) Meningococcal pneumonia in Japan: a case report and literature review. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 22(12): 833–836. ISSN 1341321X.
44. **Chan J., Stephenson K.** (2023) Diagnosis and management of middle ear disease in children. *Paediatrics and Child Health*. 33(12): 376–381. ISSN 17517222.
45. **Chandra Sahu M., Swain, S. K.** (2019) Surveillance of antibiotic sensitivity pattern in chronic suppurative *otitis media* of an Indian teaching hospital. *World Journal of Otorhinolaryngology – Head and Neck Surgery*. 5(2): 88–94. ISSN 20958811.
46. **Chapman T. J., Olarte L., Dbaiibo G., Houston A. M., Tamms G., Lupinacci R., Feemster K., Buchwald U. K., Bannietts N.** (2024) PCV15, a pneumococcal conjugate vaccine, for the prevention of invasive pneumococcal disease in infants and children. *Expert Review of Vaccines*. 23(1): 137–147. ISSN 14760584.
47. **Chen C. H., Huang C. Y., Cheng H. L., Lin H. H., Chu Y. C., Chang C. Y., Lai Y. H., Wang M. C., Cheng Y. F.** (2022) Smartphone-enabled versus conventional otoscopy in detecting middle ear disease: A meta-analysis. *Diagnostics*. 12(4): 972. ISSN 20754418.
48. **Choi S. Y., Cho Y., Lee N. J., Lee J., Chung W., Hong S. H.** (2012) Factors associated with quality of life after ear surgery in patients with chronic *otitis media*. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*. 138(9): 840–845. ISSN 08864470.
49. **Ioannidis A., Chatzipanagiotou S., Vassilaki N., Giannakopoulos P., Hatzaki D., Magana M., Sachlas A., Mpekoulis G., Radiotis A., Tsakanikos M., Tzanakaki G., Lebessi E., Tsolia M. N.** (2023) Biofilm-forming bacteria implicated in complex *otitis media* in children in the post-heptavalent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) era. *Microorganisms*. 11(3): 545. ISSN 20762607.
50. **Isaacson B.** (2018) Anatomy and surgical approach of the ear and temporal bone. *Head Neck Pathol*. 12(3): 321–327. ISSN 1936055X.
51. **Isaacson G.** (2023) The evolution of the otoscope. *Ear, Nose & Throat Journal*. 01455613231194029. ISSN 19427522.

52. **Jamal A., Alsabea A., Tarakmeh M., Safar A.** (2022) Etiology, diagnosis, complications, and management of acute *otitis media* in children. *Cureus*. 14(8): e28019. ISSN 21688184.
53. **Jaufmann J., Tümen L., Beer-Hammer S.** (2021) SLy2-overexpression impairs B-cell development in the bone marrow and the IgG response towards pneumococcal conjugate-vaccine. *Immunity, Inflammation and Disease*. 9(2): 533–546. ISSN 20504527.
54. **Johns B. E., Purdy K. J., Tucker N. P., Maddocks S. E.** (2015) Phenotypic and genotypic characteristics of small colony variants and their role in chronic infection. *Microbiology Insights*. 8: S25800. ISSN 11786361.
55. **Jolink C., Huijsman A., Dreschler W. A., Wolf M. J. F., Ebbens F. A., Spronsen E.** (2023) Surgery for chronic *otitis media* in the elderly. *American Journal of Otolaryngology*. 44(2):103698. ISSN 1532818X.
56. **Jung S. Y., Kim D., Park D. C., Lee E. H., Choi Y-S., Ryu J., Kim S. H., Yeo S. G.** (2021) Immunoglobulins and transcription factors in *otitis media*. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(6): 3201. ISSN 14220067.
57. **Kaderabkova N., Bharathwaj M., Furniss R. C. D., Gonzalez D., Palmer T., Mavridou D. A. I.** (2022) The biogenesis of β -lactamase enzymes. *Microbiology*. 168(8): 001217. ISSN 1350087.
58. **Karamitsou P., Poutoglidis A., Tsetsos N., Gougousis S., Karamitsou A., Fountarlis A. L., Skalias A.** (2023) Quality of life after mastoid surgery. Is there a real benefit to preserving the posterior wall of the external auditory canal? A systematic review and meta-analysis. 50(5): 720–726. ISSN 03858146.
59. **Kashani R. G., Młyńczak M. C., Zarabanda D., Solis-Pazmino P., Huland D. M., Ahmad I. N., Singh S. P., Valdez T. A.** (2021) Shortwave infrared otoscopy for diagnosis of middle ear effusions: a machine-learning-based approach. *Scientific Reports*. 11(1): 12509. ISSN 20452322.
60. **Kaur R., Morris M., Pichichero M. E.** (2017) Epidemiology of acute *otitis media* in the postpneumococcal conjugate vaccine era. *Pediatrics*. 140(3): e20170181. ISSN 00314005.
61. **Kenneth F.** (2018) News: diagnosing *otitis media*? Pneumatic otoscopy simplified. *Emergency Medicine News*. 40(7): 8-28. ISSN 10540725.
62. **King P.** (2012) *Haemophilus influenzae* and the lung (*Haemophilus* and the lung). *Clinical and Translational Medicine*. 1(1): e10. ISSN 20011326.

63. **Klein J. O.** (2000) Clinical implications of antibiotic resistance for management of acute *otitis media*. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 135(3): 220–224. ISSN 00222143.
64. **Kuo C. L., Shiao A. S., Yung M., Sakagami M., Sudhoff H., Wang C. H., Hsu C. H., Lien C. F.** (2015) Updates and knowledge gaps in cholesteatoma research. *BioMed Research*. (2015): 854024. ISSN 23146133.
65. **Laulajainen-Hongisto A., Aarnisalo A. A., Jero J.** (2016) Differentiating acute *otitis media* and acute mastoiditis in hospitalized children. *Current Allergy and Asthma Reports*. 16(10): 109–110. ISSN 15297322.
66. **Lee H. Y., Choi M. S., Park N. S., Cho C. S.** (2014) Applicability of spectral gradient acoustic reflectometry (earcheck): screening patients who need surgical treatment for chronic *otitis media* with effusion. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 78(1): 107–111. ISSN 01655876.
67. **Leonard A., Lalk M.** (2018) Infection and metabolism – *Streptococcus pneumoniae* metabolism facing the host environment. *Cytokine*. 112: 75–86. ISSN 10434666.
68. **Li P., Yin R., Cheng J., Lin J.** (2023) Bakterial biofilm formation on biomaterials and approaches to its treatment and prevention. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(14): 11680. ISSN 14220067.
69. **Lieberthal A. S., Carroll A. E., Chonmaitree T., Ganiats T. G., Hoberman A., Jackson M. A., Joffe M. D., Miller D. T., Rosenfeld R. M., Sevilla X. D., Schwartz R. H., Thomas P. A., Tunkel D. E.** (2013) The diagnosis and management of *acute otitis media*. *Pediatrics*. 131(3): e964–e999. ISSN 10984275.
70. **Liu X., Yao H., Zhao X., Ge C.** (2023) Biofilm formation and control of foodborne pathogenic bacteria. *Molecules*. 28(6): 2432. ISSN 14203049.
71. **Liu Y., Long S., Wang H., Wang Y.** (2024) Biofilm therapy for chronic wounds. *International Wound Journal*. 21(2): e14667. ISSN 17424801.
72. **Loughran A. J., Orihuela C. J., Tuomanen E. I.** (2019) *Streptococcus pneumoniae*: invasion and inflammation. *Microbiology Spectrum*. 7(2): 10. ISSN 21650497.
73. **Luers J. C., Hüttenbrink K. B.** (2016) Surgical anatomy and pathology of the middle ear. *Journal of Anatomy*. 228(2): 338–353. ISSN 00218782.

74. **Lundberg T., Biagio L., Laurent C., Sandström H., Swanepoel D. W.** (2014) Remote evaluation of video-otoscopy recordings in an unselected pediatric population with an *otitis media* scale. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 78(9): 1489–1495. ISSN 01655876.
75. **Lustig L. R., Ingram A., Vidrine D. M., Gould A. R., Zeiders J. W., Ow R. A., Thompson C. R., Moss J. R., Mehta R., McClay J. E., Brenski A., Gavin J., Waldman E. H., Ansley J., Yen D. M., Chadha N. K., Murray M. T., Kozak F. K., York C., Brown D. M., Grunstein E., Sprecher R. C., Sherman D. A., Schoem S. R., Puchalski R., Hills S., Calzada A., Harfe D., England L. J., Syms C. A.** (2020) In-office tympanostomy tube placement in children using iontophoresis and automated tube delivery. *The Laryngoscope*. 130(4): 1–9. ISSN 15314995.
76. **Maharjan M., Phuyal S., Shrestha M., Bajracharya R.** (2020) Chronic *otitis media* and subsequent hearing loss in children from the Himalayan region residing in Buddhist Monastic schools of Nepal. *Journal of Otology*. 15(4): 144–148. ISSN 16722930.
77. **Mahato S., Kumari Sah H., Yadav S.** (2019) Isolation of *Streptococcus pneumoniae* from the sputum samples and their antimicrobial resistance in Biratnagar, Nepal. *Journal of Microbiology & Experimentation*. 7(6): 299–304. ISSN 2373437X.
78. **Maillard J. Y., Centeleghe I.** (2023) How biofilm changes our understanding of cleaning and disinfection. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 12(1): 95. ISSN 20472994.
79. **McMahon Wicker A., Labruzzo Mohundro B.** (2010) Management of pediatric *otitis media*. *U.S. Pharmacist*. 35(3): 44–49. ISSN 23313501.
80. **Méndez A.** (2016) Optics in medicine. *Optics in Our Time*. 299–333. ISBN 9783319319032.
81. **Mirzaei R., Mohammadzadeh R., Alikhani M. Y., Moghadam M. S., Karampoor S., Kazemi S., Barfipoursalar A., Yousefimashouf R.** (2020) The biofilm-associated bacterial infections unrelated to indwelling devices. *IUBMB Life*. 72(7): 1271–1285. ISSN 15216543.
82. **Mittal R., Lisi C. V., Gerring R., Mittal J., Mathee K., Narasimhan G., Azad R. K., Yao Q., Grati M., Yan D., Eshraghi A. A., Angeli S. I., Telischi F. F., Liu X. Z.** (2015) Current concepts in the pathogenesis and treatment of chronic suppurative *otitis media*. *Journal of Medical Microbiology*. 64(10): 1103–1116. ISSN 00222615.

83. **Mittal R., Parrish J. M., Soni M., Mittal J., Mathee K.** (2018) Microbial *otitis media*: recent advancements in treatment, current challenges and opportunities. *Journal of Medical Microbiology*. 67(10): 1417–1425. ISSN 00222615.
84. **Mohd Salehuddin N. S., Md Daud M. K., Nik Othman N. A., Abd Rahman N.** (2021) Extended high frequency hearing loss in tinnitus-positive chronic suppurative *otitis media* patient. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology*. 6(5): 1137–1141. ISSN 23788038.
85. **Moraes J. C. D., Pérez Porcuna X. M., Nieto-Guevara J., Eisman A., Torres B., Gonzalez Redondo J. L., Saez-Llorens X.** (2020) Vaccination with conjugate vaccines against pneumococcal disease: What really matters. *Vacunas (English Edition)*. 21(1): 23–40. ISSN 24451460.
86. **Morris D. E., Osman K. L., Cleary D. W., Clarke S. C.** (2022) The characterization of *Moraxella catarrhalis* carried in the general population. *Microbial Genomics*. 8(5): 000820. ISSN 20575858.
87. **Morris P.** (2013) Chronic suppurative *otitis media*. *American Family Physician*. 88(10): 694–696. ISSN 17528526.
88. **Muderris T., Yazıcı A., Bercin S., Yalçın G., Sevil E., Kırıs M.** (2013) Consumer acoustic reflectometry: accuracy in diagnosis of *otitis media* with effusion in children. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 77(10): 1771–1774. ISSN 01655876.
89. **Murphy T. F.** (2009) Vaccine development for *Moraxella catarrhalis*: rationale, approaches and challenges. *Expert Review of Vaccines*. 8(6): 655–658. ISSN 14760584.
90. **Murphy T. F.** (2015) Vaccines for nontypeable *Haemophilus influenzae*: the future is now. *Clinical and Vaccine Immunology*. 22(5): 459–466. ISSN 15566811.
91. **Nagar R. R., Deshmukh P. T.** (2022) An overview of the tympanostomy tube. *Cureus*. 14(10): e30166. ISSN 21688184.
92. **Naus M.** (2023) New pneumococcal conjugate vaccines for older and high-risk adults. *British Columbia Medical Journal*. 65(10): 387–388. ISSN 22936106.
93. **Novotny L. A., Brockman K. L., Mokrzan E. M., Jurcisek J. A., Bakaletz L. O.** (2019) Biofilm biology and vaccine strategies for *otitis media* due to nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Journal of Pediatric Infectious Diseases*. 14(2): 69–77. ISSN 13057707.

94. **Park M., Han K. H., Jung H., Kim M. H, Chang H. K., Kim S. H., Park M. K., Lee J. H.** (2015) Usefulness of 1000-Hz probe tone in tympanometry according to age in Korean infants. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 79(1): 42–46. ISSN 01655876.
95. **Parlea E., Georgescu M., Calarasu R.** (2012) Tympanometry as a predictor factor in the evolution of *otitis media* with effusion. *Journal of Medicine and Life*. 5(4): 452–454. ISSN 18443117.
96. **Paton J. C., Trappetti C.** (2019) *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide. *Microbiology Spectrum*. 7(2): 0019. ISSN 21650497.
97. **Paul C. R., Moreno M. A.** (2020) Acute *otitis media*. *JAMA Pediatr*. 174(3): 308. ISSN 21686203.
98. **Perez A. C., Murphy T. F.** (2017) A *Moraxella catarrhalis* vaccine to protect against *otitis media* and exacerbations of COPD: an update on current progress and challenges. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 3(10): 2322–2331. ISSN 21645515.
99. **Perez A. C., Pang B., King L. B., Tan L., Murrah K. A., Reimche J. L., Wren J. T., Richardson S. H., Ghandi U., Swords W. E.** (2014) Residence of *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* within polymicrobial biofilm promotes antibiotic resistance and bacterial persistence *in vivo*. *Pathogens and Disease*. 70(3): 280–288. ISSN 2049632X.
100. **Prakash P., Singh R. K., Sinha R.** (2023) The impact of inferior turbinate reduction on middle ear function in adults with nasal obstruction. *Cureus* 15(11): e48535. ISSN 21688184.
101. **Prasad A., Syed Mohammad A. H., Gartia M. R.** (2020) Optical identification of middle ear infection. *Molecules*. 25(9): 2239. ISSN 14203049.
102. **Qureishi A., Lee Y., Belfield K., Birchall J. P., Matija D.** (2014) Update on *otitis media* – prevention and treatment. *Infection and Drug Resistance*. (7): 15–24. ISSN 11786973.
103. **Ramakrishnan K., Sparks R. A., Berryhill W. E.** (2007) Diagnosis and treatment of *otitis media*. *American Family Physician*. 76(11): 1650–8. ISSN 0002838X.
104. **Romaneli M. T. D. N., Tresoldi A. T., Pereira R. M., Garcia M. T., Hofling C. C., Resende M. R.** (2019) Invasive Non-type B *Haemophilus influenzae* disease: report of eight cases. *Revista Paulista de Pediatria*. 37(2): 156–160. ISSN 19840462.

105. **Rosenow C., Ryan P., Weiser J. N., Johnson S., Fontan P., Ortqvist A., Masure H. R.** (2004) Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*. 25(5): 819–829. ISSN 0950382X.
106. **Sadowy E., Hryniewicz W.** (2020) Identification of *Streptococcus pneumoniae* and other Mitis Streptococci: importance of molecular methods. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 39(12): 2247–2256. ISSN 0934-9723.
107. **Saraf A., Manhas M., Jamwal P. S., Begh R. A., Kalsotra P.** (2022) Comparative study of overlay and underlay techniques of myringoplasty – our experience. *Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery*. 74(1): 426–432. ISSN 22313796.
108. **Sarno L. D., Cammisa I., Curatola A., Pansini V., Eftimiadi G., Gatto A., Chiaretti A.** (2023) A scoping review of the management of acute mastoiditis in children: what is the best approach? *The Turkish Journal of Pediatrics*. 65(6): 906–918. ISSN 00414301.
109. **Segundo G. R. S., Condino-Neto A.** (2021) Treatment of patients with immunodeficiency: medication, gene therapy, and transplantation. *Jornal de Pediatria*. 97(1): S17–S23. ISSN 00217557.
110. **Seong D., Ki W., Kim P., Lee J., Han S., Yi S., Kim H. K., Jeon M., Kim J.** (2022) Virtual intraoperative optical coherence tomography angiography integrated surgical microscope for simultaneous imaging of morphological structures and vascular maps *in vivo*. *Optics and Lasers in Engineering*. 151: 106943. ISSN 01438166.
111. **Sergi B., Galli J., De Corso E., Parrilla C., Paludetti G.** (2011) Overlay versus underlay myringoplasty: report of outcomes considering closure of perforation and hearing function. *Clinic of Otorhinolaryngology*. 31(6): 366–71. ISSN 1827675X.
112. **Sharma A., Gupta V. K., Pathania R.** (2019) Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian Journal of Medical Research*. 149(2): 129–145. ISSN 09715916.
113. **Sharma S., Mohler J., Mahajan S. D., Schwartz S. A., Bruggemann L., Aalinkeel R.** (2023) Microbial biofilm: A review on formation, infection, antibiotic resistance, control measures, and innovative treatment. *Microorganisms*. 11(6): 1614. ISSN 20762607.
114. **Silva N. B. S., Marques L. A., Röder D. D. B.** (2021) Diagnosis of biofilm infections: current methods used, challenges and perspectives for the future. *Journal of Applied Microbiology*. 131(5): 2148–2160. ISSN 13645072.

115. **Skiba-Kurek I., Nowak P., Empel J., Tomczak M., Klepacka J., Sowa-Sierant I., Żak I., Pomierny B., Karczewska E.** (2021) Evaluation of biofilm formation and prevalence of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from neonates with sepsis in Southern Poland. *Pathogens*. 10(7): 877. ISSN 20760817.
116. **Srinivasan R., Santhakumari S., Poonguzhali P., Geetha M., Dyavaiah M., Xiangmin L.** (2021) Bacterial biofilm inhibition: A focused review on recent therapeutic strategies for combating the biofilm mediated infections. *Frontiers in Microbiology*. 12: 676458. ISSN 1664302X.
117. **Su Y., Yrastorza J. T., Matis M., Cusick J., Zhao S., Wang G., Xie J.** (2022) Biofilms: formation, research models, potential targets, and methods for prevention and treatment. *Advanced Science*. 9(29): 2203291. ISSN 21983844.
118. **Sundvall P. D., Papachristodoulou C. E., Nordeman L.** (2019) Diagnostic methods for acute *otitis media* in 1 to 12 year old children: a cross sectional study in primary health care. *BMC Family Practice*. 20(1): 127. ISSN 14712296.
119. **Takano C., Seki M., Kim D. W., Kilgore P. E., Fuwa K., Takahashi K., Inazaki T., Hayakawa, S.** (2017) Molecular serotype-specific identification of non-type b *Haemophilus influenzae* by loop-mediated isothermal amplification. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1877. ISSN 1664302X.
120. **Te Molder M., De Hoog M. L. A., Uiterwaal C. S. P. M., Van Der Ent C. K., Smit H. A., Schilder A. G. M., Damoiseaux R. A. M. J., Venekamp R. P.** (2016) Antibiotic treatment for first episode of acute *otitis media* is not associated with future recurrences. *Public Library of Science*. 11(9): e0160560. ISSN 19326203.
121. **Teague M. S., Nolan R. M.** (2023) Evaluation of the impact of optical coherence tomography on pediatrician otologic examination judgment. *OTO Open*. 7(1): e41. ISSN 2473974X.
122. **Thong B. Y., Pawankar R., Park H. S., Abdul Latiff A. H.** (2023) Evaluating immune responses to pneumococcal vaccines. *Asia Pacific Allergy*. 3(3): 127–131. ISSN 22338276.
123. **Tikhomirova A., Kidd S. P.** (2013) *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*: living together in a biofilm. *Pathogens and Disease*. 69(2): 114–126. ISSN 2049632X.

124. **Tong J., Chen W., Deng Y., Cai X., Shan L., Du L.** (2015) Surgical approaches to treating *otitis media* in the only hearing ear of patients with contralateral hearing loss. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 8(6): 9985–90. ISSN 19405901.
125. **Van Eldere J., Slack M. P. E., Ladhani S., Cripps A. W.** (2014) Non-typeable *Haemophilus influenzae*, an under-recognised pathogen. *The Lancet Infectious Diseases*. 14(12): 1281–1292. ISSN 14733099.
126. **Vanneste P., Page C.** (2019) *Otitis media* with effusion in children: pathophysiology, diagnosis, and treatment. A review. *Journal of Otology*. 14(2): 33–39. ISSN 16722930.
127. **Venekamp R. P., Damoiseaux R. A., Schilder A. G.** (2017) *Acute otitis media* in children. *American Family Physician*. 95(2): 109–110. ISSN 15320650.
128. **Verhaegh S. J. C., Schaar V., Ching Su Y., Riesbeck K., Hays J. P.** (2015) *Moraxella catarrhalis*. *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition). 3: 1565–1586. ISBN 9780123971692.
129. **Vermeë Q., Cohen R., Hays C., Varon E., Bonacorsi S., Bechet S., Thollot F., Corrard F., Poyart C., Levy C., Raymond J.** (2019) Biofilm production by *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* isolated from the nasopharynx of children with acute *otitis media*. *BMC Infectious Diseases*. 19(1): 44. ISSN 14712334.
130. **Vestby L. K., Grønseth T., Simm R., Nesse L. L.** (2020) Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*. 9(2): 59. ISSN 20796382.
131. **Weber D. J., Rutala W. A., Anderson D. J., Sickbert-Bennett E. E.** (2023) Biofilms on medical instruments and surfaces: do they interfere with instrument reprocessing and surface disinfection. *American Journal of Infection Control*. 51(11): A114–A119. ISSN 01966553.
132. **Wen S., Feng D., Chen D., Yang L., Xu Z.** (2020) Molecular epidemiology and evolution of *Haemophilus influenzae*. *Infection, Genetics and Evolution*. 80: 1567–1348. ISSN 15671348.
133. **Wiederhold M. L., Zajtchuk J. T., Vap J. G., Paggi R. E.** (1980) Hearing loss in relation to physical properties of middle ear effusions. *The Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*. 89(3 Pt 2): 185–189. ISSN 00034894.

134. **Won J., Huang P. C., Boppart S. A.** (2020) Phase-based eulerian motion magnification reveals eardrum mobility from pneumatic otoscopy without sealing the ear canal. *Journal of Physics: Photonics*. 2(3): 034004. ISSN 25157647.
135. **Yatsyshina S., Mayanskiy N., Shipulina O., Kulichenko T., Alyabieva N., Katosova L., Lazareva A., Skachkova T., Elkina M., Matosova S., Shipulin G.** (2016) Detection of respiratory pathogens in pediatric acute *otitis media* by PCR and comparison of findings in the middle ear and nasopharynx. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 85(1): 125–130. ISSN 07328893.
136. **Zahid A., Wilson J. C., Grice I. D., Peak I. R.** (2024) *Otitis media*: recent advances in *otitis media* vaccine development and model systems. *Frontiers in Microbiology*. 15: 1345027. ISSN 1664302X.
137. **Zeng X., Jiang Z., Luo W., Li H., Li H., Li G., Shi J., Wu K., Liu T., Lin X., Wang F., Li Z.** (2021) Efficient and accurate identification of ear diseases using an ensemble deep learning model. *Scientific Reports*. 11(1): 10839. ISSN 20452322.
138. **Zernotti M. E., Pawankar R., Ansotegui I., Badellino H., Croce J. S., Hossny E., Ebisawa M., Rosario N., Borges M. S., Zhang Y., Zhang L.** (2017) *Otitis media* with effusion and atopy: is there a causal relationship? *World Allergy Organization Journal*. 10(1): 37. ISSN 19394551.