



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Porovnání detekce tvorby biofilmu u klinických
kmenů *Staphylococcus aureus* z ran pomocí
kultivačních a genetických metod

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**

Autor: Bc. Tereza Válková

Vedoucí práce: Mgr. Lukáš Vacek, Ph.D.

České Budějovice 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Porovnání detekce tvorby biofilmu u klinických kmenů *Staphylococcus aureus* z ran pomocí kultivačních a genetických metod jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 29.4.2024

Podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Lukáši Vackovi, Ph.D., za jeho odborné vedení, podporu a cenné rady při psaní mé bakalářské práce. Dále také děkuji mé rodině a přátelům, kteří mi byli oporou během celého mého studia a bez kterých bych tuto práci nemohla dokončit.

Porovnání detekce tvorby biofilmu u klinických kmenů *Staphylococcus aureus* z ran pomocí kultivačních a genetických metod

Abstrakt

Hlavním tématem této bakalářské práce je bakterie *Staphylococcus aureus*, její schopnost tvorby biofilmu a diagnostiky tohoto vytvořeného biofilmu.

Teoretická část práce se nejprve zaměřuje na samotnou bakterii, její morfologii, antigenní stavbu a faktory virulence. Dále bude popsána její patogeneze a patogenita, včetně problematiky meticilin rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus*. Další část se pak zaměřuje na biofilm. Bude popsáno složení, struktura a tvorba biofilmu. Dále pak jeho role v patogenitě, možnostech léčby a různé způsoby detekce.

Praktická část popisuje způsoby detekce biofilmu. První metodou je barvení krystalovou violetí dle Christensena. Tato metoda vyšla pozitivní pro všech 94 zkoumaných kmenů *Staphylococcus aureus*. A dále bylo provedeno rozřazení těchto kmenů do kategorií podle míry produkce biofilmu. Druhou metodou bylo Real-time PCR a detekce vybraných genů, zodpovědných za tvorbu biofilmu: *clfA*, *fnbA* a *fnbB*. U 93 vzorků byly nalezeny 2 až 3 geny, pouze u jednoho vzorku nebyl detekován ani jeden z vybraných genů. Bylo tedy prokázáno, že všechny kmeny jsou schopny v různé míře tvorby biofilmu a neprokázala se souvislost mezi přítomností zkoumaných genů a mírou produkce biofilmu.

Klíčová slova

Staphylococcus aureus; biofilm; Christensenova metoda; Real-time PCR; gen

Comparison of detection of biofilm formation in clinical strains of *Staphylococcus aureus* from wounds using culture and genetic methods

Abstract

The main topic of this bachelor thesis is the bacterium *Staphylococcus aureus*, its ability to form a biofilm and the diagnostics of this formed biofilm.

The theoretical part of the thesis first focuses on the bacterium itself, its morphology, antigenic structure and virulence factors. Furthermore, its pathogenesis and pathogenicity will be described, including the issue of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The next part focuses on the biofilm. The composition, structure and formation of biofilm will be described, as well as its role in pathogenicity, treatment options and various methods of detection.

The practical part describes methods of biofilm detection. The first method is crystal violet staining according to Christensen. This method came out positive for all 94 tested strains of *Staphylococcus aureus*. Subsequently, these strains were divided into categories according to the strength of biofilm production. The second method was Real-time PCR and the detection of selected genes responsible for biofilm formation: *clfA*, *fnbA* and *fnbB*. 2–3 genes were found in 93 samples, and only one sample contained none of the selected genes. Thus, it was shown that all strains are capable of biofilm formation to varying degrees, and no correlation was found between the presence of the examined genes and the level of biofilm production.

Key words

Staphylococcus aureus; biofilm; Christensen method; Real-time PCR; gene

Obsah

1	Úvod	8
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.1	Morfologie.....	9
2.2	Antigenní stavba.....	9
2.3	Faktory virulence	9
2.4	Patogeneze a patogenita	10
2.5	Meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.6	Léčba	12
2.7	Laboratorní diagnostika	12
2.7.1	Kultivace	12
2.7.2	Identifikace	13
3	Biofilm.....	14
3.1	Tvorba biofilmu	14
3.2	Složení a struktura biofilmu	15
3.3	Quorum sensing	16
3.4	Biofilm a jeho role v patogenitě.....	16
3.5	Biofilm a <i>Staphylococcus aureus</i>	17
4	Detekce biofilmu	19
4.1	Christensenova metoda	19
4.2	Kultivace na agaru s kongo červení	19
4.3	Mikroskopické metody.....	20
4.4	Metabolické metody.....	22
4.5	Genetické metody.....	22
5	Cíle práce.....	23
6	Materiál a metody	24
6.1	Materiál	24

6.1.1	Chemikálie	24
6.1.2	Použité kmeny.....	25
6.1.3	Přístroje a pomůcky	25
6.2	Metody	25
6.2.1	Testování schopnosti stafylokoků tvořit biofilm pomocí Christensenovy metody 26	
6.2.2	Průkaz přítomnosti genů pro tvorbu biofilmu pomocí Real-time PCR	27
6.3	Statistické vyhodnocení	28
7	Výsledky.....	29
7.1	Výsledky testování schopnosti stafylokoků tvořit biofilm pomocí Christensenovy metody	29
7.2	Výsledky detekce genů pro tvorbu biofilmu testovaných kmenů stafylokoků pomocí Real-time PCR	32
7.3	Porovnání Christensenovy metody a Real-time PCR	33
8	Diskuze	36
9	Závěr.....	40
10	Seznam použitých zdrojů	41
11	Seznam obrázků.....	49
12	Seznam tabulek.....	50
13	Seznam zkratk.....	51

1 Úvod

Staphylococcus aureus je grampozitivní bakterie, známá svou schopností vyvolávat širokou škálu infekcí u člověka, od mírných infekcí kůže, až po smrtelné sepse. Tato bakterie je také schopna tvořit biofilmy, které hrají klíčovou roli v její virulenci (Schilcher a Horswill, 2020). Biofilm je komplexní mikrobiální společenství, které je obklopeno mezibuněčnou slizovitou hmotou neboli extracelulární polymerní substancí, která tvoří většinu objemu biofilmu a umožňuje proudění živin a bakteriální komunikaci pomocí tzv. quorum sensing. Biofilm je pak schopný adherovat k různým povrchům, jako jsou například katetry, implantáty a jiné zdravotnické pomůcky, což může vést ke vzniku perzistentních infekcí a dalším zdravotním komplikacím (Srinivasan *et al.*, 2021). Bakterie v biofilmu jsou totiž odolnější vůči antibiotikům a imunitnímu systému člověka. Léčba biofilmových infekcí je tedy velice komplikovaná a nejlépe je tomuto problému předcházet důkladným dodržováním hygienických postupů (Lebeaux *et al.*, 2014). Tvorba biofilmu je geneticky kódovaná a v případě *Staphylococcus aureus* bylo odhaleno několik genů, které jsou zodpovědné za jeho tvorbu, jsou to například gen *icaABCD*, *clfAB*, *fnbAB*, *fib* či *eno* (Idrees *et al.*, 2021).

2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus je rod běžně se vyskytujících grampozitivních bakterií a většina jeho zástupců jsou komenzálové nebo oportunní patogeny, které osidlují lidskou i zvířecí pokožku a sliznice. Stafylokoky můžeme rozdělit do dvou důležitých skupin, podle jejich schopnosti koagulovat plazmu, a to na koaguláza pozitivní a koaguláza negativní. Z hlediska patogenity jsou pro člověka nejvýznamnější *Staphylococcus aureus* (koaguláza pozitivní), *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus saprophyticus* (oba koaguláza negativní). *Staphylococcus aureus* je při oslabení imunitního systému schopen způsobovat celou řadu onemocnění s různou mírou závažnosti. Jsou to například kožní záněty, pneumonie, abscesy, endokarditida, osteomyelitida až sepse a celkové selhání organismu (Haag *et al.*, 2019).

2.1 *Morfologie*

S. aureus je grampozitivní, nesporulující, nepohyblivá bakterie mající tvar koku, o průměrné velikosti 0,8 μm . Pod mikroskopem tyto koky tvoří typický tvar hroznů. *S. aureus* může růst jak v anaerobním, tak aerobním prostředí. Optimální růst nastává při teplotě 37 °C a pH 7,4. Kolonie jsou velké 1–3 mm, neprůhledné, hladké, s rovnými okraji a krémové konzistence. Kolonie bývají obvykle pigmentované, typická je barva krémová, zlatožlutá až naoranžovělá. Tyto kolonie bývají většinou hemolytické (Guo *et al.*, 2020).

2.2 *Antigenní stavba*

Součástí buněčné stěny *S. aureus* je peptidoglykan, kyselina teichoová a protein A. Tyto její složky mají velký podíl v patogenezi infekce. Peptidoglykan podněcuje uvolňování cytokinů z makrofágů, aktivaci komplementu a shlukování krevních destiček. Kyselina teichoová se váže na fibronectin a pomáhá stafylokokům v adhezi na sliznice a extracelulární matrix. Protein A je hlavní součástí buněčné stěny. Má schopnost vázat se na Fc fragment imunoglobulinů a zabraňuje tak opsonizaci stafylokoka (Foster, 2002).

2.3 *Faktory virulence*

Virulence je individuální vlastnost bakterií, vyjadřující její míru patogenity. *S. aureus* má těchto faktorů virulence veliký počet a můžeme je rozdělit na povrchové a extracelulární.

Povrchové virulence

Mezi povrchové řadíme peptidoglykan buněčné stěny, protein A (viz kapitola 2.2) a dále pak vázanou koagulázu, která katalyzuje přeměnu fibrinogenu na fibrin a způsobuje shlukování stafylokokových buněk (Votava, 2003).

Extracelulární faktory virulence

Extracelulární faktory dělíme na enzymy a toxiny.

Mezi enzymy patří: koaguláza, kataláza, hyaluronidáza, lipázy, nukleázy, fibrinolysin a penicilináza. Koaguláza v reakci s plasmatickým faktorem vede ke vzniku stafylothrombinu, který katalyzuje přeměnu fibrinogenu na fibrin. Tvorba fibrinu je pak důvodem, proč stafylokokové infekce probíhají většinou ohraničeně (např. absces). Kataláza štěpí pro *S. aureus* toxický peroxid vodíku na kyslík a vodu. Hyaluronidáza usnadňuje šíření stafylokoků ve tkáních štěpením kyseliny hyaluronové. Lipázy pomáhají stafylokokům invadovat mazové žlázy a podkožní tkáň. Nukleázy napadají jádra leukocytů. Fibrinolysin rozpouští fibrinové sraženiny. Penicilináza rozkládá beta-laktamový kruh a inaktivuje tím beta-laktamová antibiotika (Votava 2003).

K toxinům řadíme: cytolyziny (hemolyziny a leukocidiny), enterotoxiny, toxin syndromu toxického šoku a exfoliativní toxiny. Cytolyziny poškozují povrchové membrány buněk. Patří k nim hemolyziny alfa, beta, gama a delta a Panton-Valentinův leukocidin. Hemolyzin alfa má cytolytický efekt, beta působí jako sfingomyelináza C a odpovídá za poškozování tkání a tvorbu abscesů, gama tvoří póry v membránách buněk a delta je toxický pro makrofágy a lymfocyty (Hurych a Štícha, 2021). Enterotoxiny (A-E, F-R) jsou značně odolné vůči vysokým teplotám a žaludečním enzymům. Tyto toxiny vyvolávají nevolnosti, zvracení a průjem. Toxin syndromu toxického šoku je superantigen a je příčinou multiorgánového selhání při syndromu toxického šoku. Exfoliatiny rozpouštějí mukopolysacharidovou matrix v epidermis a způsobují syndrom opařené kůže, projevující se loupáním pokožky (Votava 2003).

2.4 Patogeneze a patogenita

Zásadní pro vznik stafylokokové infekce je překonání ochranné bariéry lidského těla, a to zejména pokud je tato bariéra již narušena, např. poranění, operační rána, poškození sliznic, ucpání vlasového folikulu nebo třeba kolonizovaný katétr (Hurych a Štícha,

2021). Stafylokoky způsobují tři druhy onemocnění: hnisavé infekce, typicky s tvorbou abscesu (nejčastější), infekce s toxickými příznaky a otravy z potravin (Votava, 2010).

Mezi nejběžnější stafylokoková onemocnění patří infekce kůže a jejích adnex (pyodermie), z nichž nejčastější je impetigo (povrchové intraepidermální zánět, často u malých dětí) a folikulitida (infekce vlasového folikulu). Dále to jsou infekce pohybového aparátu, jako je například septická artritida (hnisavá infekce kloubu), osteomyelitida a spondylodiscitida (infekce dlouhých kostí a obratlů). K závažným infekcím řadíme respirační infekce, zejména pneumonie. Ty se rozvíjejí obvykle při narušení respiračního epitelu, ke kterému dochází např. virovou infekcí nebo u starších lidí s bronchitidou. Nebezpečné jsou také infekce krevního řečiště, jako je infekční endokarditida (zánět endoteliální výstelky srdce) a tromboflebitida (hnisavý zánět žíly) (Hurych a Štícha, 2021).

Vlivem stafylokokových toxinů může vznikat enterotoxikóza, syndrom toxického šoku a syndrom opařené kůže. K enterotoxikóze dochází pozřením potravin s toxinem. Symptomy jsou nevolnost, zvracení a silný průjem. Nemoc spontánně odezní při odstranění toxinu ze zažívacího traktu. Syndrom toxického šoku je vyvolaný bakteriemi produkujícími toxin syndromu toxického šoku. Nemoc se projevuje vysokou horečkou, hypotenzí a erytému s odlupující se kůží. Toto onemocnění může vzniknout jako komplikace jakéhokoliv stafylokokového onemocnění a může vést až k multiorgánovému selhání. Syndrom opařené kůže je relativně vzácné onemocnění, způsobují jej stafylokoky produkující exfoliatin. Při tomto onemocnění dochází ke vzniku puchýřků a odlučování povrchové vrstvy kůže (Hurych a Štícha, 2021).

2.5 Meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

MRSA neboli meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* jsou *S. aureus* rezistentní nejenom k penicilinu, ale také k meticilinu, oxacilinu a dalším příbuzným beta-laktamovým antibiotikům, která se ve světě běžně používají jako antibiotika první volby v léčbě infekcí vyvolaných *S. aureus*. Beta-laktamová antibiotika inhibují stavbu buněčné stěny bakterií vazbou beta-laktamového kruhu na proteiny v buněčné stěně bakterie. V případě MRSA je rezistence vůči nim vázaná na genu *mecA*, který se nachází na chromozomové kazetě SCCmec. Gen *mecA* kóduje enzym PBP2A (penicilin-binding protein), který je méně afinitní k meticilinu a umožňuje bakterii syntetizovat buněčnou stěnu i v jeho přítomnosti.

Kmeny MRSA můžeme rozdělit do dvou podkategorií, a to komunitní MRSA a nozokomiální MRSA. Kmeny komunitní MRSA se častěji vyskytují v kolektivech zdravých a mladých lidí a k nákaze dochází mimo zdravotnické zařízení. Nozokomiální neboli nemocniční kmeny MRSA se zpravidla vyskytují ve zdravotnických zařízení či v zařízeních dlouhodobé péče a k nákaze dochází až zde. Mezi rizikové pacienty patří oslabení a starší pacienti (Žemličková a Habalová, 2017).

2.6 Léčba

V případě lokalizovaných infekcí je základem chirurgická léčba, tedy otevření abscesu a vypuštění a drenáž hnisu. Antibiotická léčba je složitější, vzhledem k získané rezistenci na penicilin. U většiny *S. aureus* se k terapii používá oxacilin, makrolidy nebo linkosamidy. MRSA se léčí vankomycinem a jako záložní antibiotikum se používá linezolid, který je zároveň lékem volby pro VRSA (vankomycin rezistentní *Staphylococcus aureus*) (David a Daum, 2017).

Pro léčbu infekcí způsobených kmeny MRSA se používají glykopeptidová antibiotika s baktericidním účinkem (vankomycin, teikoplanin a telavancin), daptomycin, ceftarolin nebo například linezolid. Prevalence MRSA v Evropě je od 1 do 50 % přičemž nejnižší výskyt je v severských státech a incidence stoupá směrem na jih (Žemličková a Habalová, 2017). K roku 2022 je dle Evropského střediska pro prevenci a kontrolu nemocných v České republice podíl MRSA 7,5 % (European Centre for Disease Prevention and Control, 2024)

2.7 Laboratorní diagnostika

Základním materiálem pro diagnostiku je hnis (tekutina), dále pak krev, exsudáty, aspiráty, moč či sputum.

2.7.1 Kultivace

Stafylokoky rostou na běžných laboratorních půdách, vhodný je krevní agar. K cílenému průkazu se pak používá krevní agar s 10 % NaCl, který potlačuje gramnegativní koky. Kultivace obvykle probíhá při 37 °C v aerobním prostředí. Na krevním agaru se kolem kolonií *S. aureus* vytváří β -hemolýza (Missiakas a Schneewind, 2013)

2.7.2 Identifikace

Stafylokoky jsou kataláza pozitivní, čímž se odlišují od ostatních grampozitivních koků jako jsou streptokoky a enterokoky. K odlišení *S. aureus* od ostatních stafylokoků se využívá jeho schopnosti koagulace krevní plasmy. *S. aureus* je pozitivní, zatímco *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus* a další jsou negativní. Další rozlišovacím testem je průkaz hyaluronidázy. Ta se vyskytuje pouze u *S. aureus* a pokud je ten naočkovaný do pásu již narostlého *Streptococcus equii*, dochází k viditelnému rozpuštění hlenovitého pouzdra *S. equii* (Foster, 1996).

Další možností identifikace *S. aureus* jsou různé biochemické testy, ve kterých se zjišťuje např. utilizace cukrů, produkce fosfatáz, štěpení močoviny nebo tvorba acetoinu. K tomu se mohou využívat různé komerční soupravy. Další možností detekce je analýza DNA pomocí PCR nebo metoda MALDI-TOF (Votava, 2010).

3 Biofilm

Biofilm byl poprvé popsán Dr. J. Williamem Costertonem a jeho kolegy v roce 1978, kteří jej charakterizovali jako společenství mikroorganismů přichycených k povrchu biomateriálů, vzájemně propojených extracelulární matrix (Costerton *et al.*, 1978). V dnešní době popisujeme biofilm jako komplexní společenstvo mikroorganismů, zejména bakterií, které adhezuje k různým povrchům a je obklopeno slizovitou hmotou, která se nazývá extracelulární polymerní substance (Schilcher a Horswill, 2020).

Biofilm je schopný se tvořit na různých površích a materiálech, jako jsou například kovy, sklo, plasty a tkáně. Zde pak způsobuje různé problémy, jako je třeba koroze a destrukce daného materiálu. Velkým problémem je pak tvorba biofilmu v oblasti medicíny, kde může hrát klíčovou roli v oblasti patogenity. Biofilm má tendenci se tvořit na lékařských pomůckách, jako jsou například katetry a implantáty a být tak zdrojem perzistentních infekcí a různých zdravotních komplikací, neboť bakterie v biofilmu jsou mnohem odolnější vůči antibiotikům a imunitnímu systému člověka (Srinivasan *et al.*, 2021).

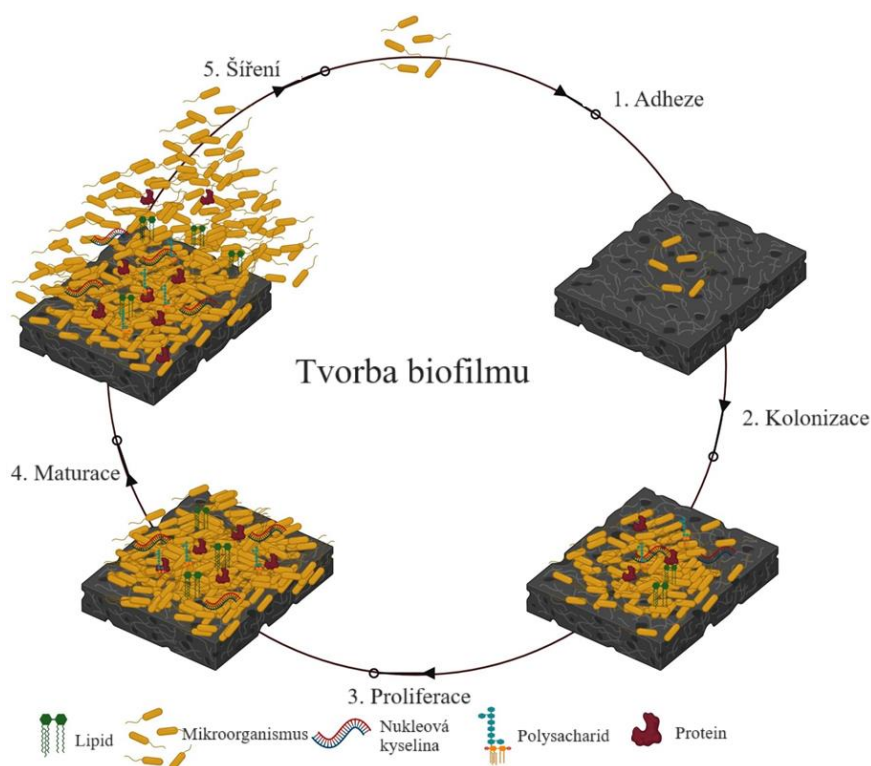
3.1 Tvorba biofilmu

Tvorbu biofilmu můžeme rozdělit do několika fází, viz Obrázek 1.

1. Adheze. V první fázi dochází k přichycení volných buněk k povrchu pomocí slabých vazebných interakcí, jako jsou například acidobazické, hydrofobní, elektrostatické nebo van de Waalsovy síly. Tato fáze je reverzibilní.
2. Kolonizace. Během kolonizace dochází k nenávrtnému přilnutí k povrchu prostřednictvím silnějších prvků, jako jsou adhezivní proteiny, lipopolysacharidy, bičíky a pili. Zároveň se začínají vytvářet první mikrokolonie bakterií. Tato fáze je již ireverzibilní.
3. Proliferace. V momentě, kdy jsou bakterie pevně přichyceny k povrchu, nastává fáze buněčného dělení a množení. Zároveň bakterie produkují extracelulární polymery, které pomáhají udržet vhodné prostředí pro bakterie v biofilmu.
4. Maturace. Postupem času začínají bakteriální buňky tvořit zralý biofilm s komplexní trojrozměrnou strukturou.

5. Šíření. V poslední fázi se vyzrálé buňky mohou začít odlučovat do okolního prostředí a pokračovat v kolonizaci dalších prostředí.

Růst biofilmu je také ovlivněn typem povrchu, ke kterému se mikroorganismy přichycují, vnějšími podmínkami a typem mikroorganismů, které se v něm nacházejí. Zároveň bylo zjištěno, že růst bakterií v biofilmu je pomalejší, než kdyby se buňky pohybovaly volně. To je pravděpodobně ovlivněno limitovaným přístupem k živinám a kyslíku v biofilmu (Srinivasan *et al.*, 2021; Verderosa *et al.*, 2019).



Obrázek 1. Fáze tvorby biofilmu (Srinivasan *et al.*, 2021), upraveno.

3.2 Složení a struktura biofilmu

Biofilm je složený zejména z mikrobiálních buněk (15–20 % objemu) tvořících mikrokolonie, obklopených extracelulární polymerní substancí (80–85 % objemu). V menším množství se zde pak mohou nacházet nebuněčné prvky, jako jsou minerální krystaly, korozní částice nebo krevní složky, v závislosti na prostředí, kde se biofilm utvořil. Celý biofilm je pak propojený systémem kanálků a mikroprostor, které umožňují proudění živin, vody a odpadních látek. Většina biofilmů vyskytujících se v přírodě se skládá z vyššího počtu různých mikrobiálních druhů, biofilm je tudíž velmi heterogenní s výraznou fyzikální, chemickou a biologickou diverzitou (Donlan, 2002; Dufour *et al.*, 2012).

Extracelulární polymerní substance

EPS je hlavní složkou biofilmu, tvoří až 85 % celkového objemu. Jde v zásadě o slizovitou matici, která tvoří ochranné prostředí pro mikroorganismy a zároveň podporuje uchycení k povrchu. Skládá se zejména z polysacharidů, dále pak proteinů, extracelulární DNA a lipidů. Právě díky přítomnosti EPS jsou bakterie v biofilmu tak odolné vůči antibiotikům, neboť je pro ně těžké touto vrstvou proniknout (Donlan, 2002). Další důležitou funkcí EPS je schopnost udržet mikrobiální buňky v těsné blízkosti, což umožňuje efektivní komunikaci mezi buňkami (quorum sensing) a usnadnění výměny genetického materiálu prostřednictvím horizontálního přenosu genů (Verderosa *et al.*, 2019).

3.3 Quorum sensing

Quorum sensing je komunikační mechanismus mezi jednotlivými bakteriemi. Díky tomuto mechanismu je umožněna komunikace a koordinace různých buněčných procesů, jako je například tvorba biofilmu, produkce toxinů nebo společný pohyb (González a Keshavan, 2006). Quorum sensing funguje tak, že jednotlivé buňky produkují a uvolňují malé signální molekuly, které se nazývají autoinduktory. V momentě, kdy koncentrace těchto molekul dosáhne prahové koncentrace, buňky zareagují na signál a dojde k potřebné reakci (Zhao *et al.*, 2020). Existuje celá řada těchto signálních molekul a je zde rozdíl mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi. Grampozitivní bakterie produkují hlavně autoindukční peptidy. Gram negativní pak produkují acyl-homoserin laktony. Oboje, grampozitivní i gramnegativní bakterie, jsou pak schopny produkovat autoinduktory-2. Tyto tři skupiny signálních molekul patří mezi nejvíce prozkoumané, zejména kvůli jejich roli v bakteriálním růstu a patogenezi (Jiang *et al.*, 2019).

3.4 Biofilm a jeho role v patogenitě

Biofilm hraje důležitou roli v patogenezi onemocnění. Biofilm se může tvořit na zdravotnických pomůckách, jako jsou centrální žilní katetry, močové katetry, protézy, endoprotézy nebo kardiostimulátory (Samal a Das, 2018). Byla také prokázána jeho asociace s rozvojem různých onemocnění, jako jsou například otitis media, infekční endokarditida, infekce ran, bakteriální vaginóza, cystická fibróza nebo infekce močového traktu (Vestby *et al.*, 2019).

Bakterie v biofilmu jsou odolné jak vůči antibiotikům, tak vůči imunitnímu systému člověka. Bylo prokázáno, že EPS snižuje pronikání leukocytů do biofilmu, omezuje jejich pohyb v něm a snižuje jejich schopnost degranulace a produkce reaktivního kyslíku, a tudíž znemožňuje fagocytózu (Samal a Das, 2018). Zároveň zatímco volně se pohybující bakterie mohou být antibiotiky plně zneškodněny, biofilm slouží jako rezervoár buněk, které se z něj uvolňují do okolí, popř. přímo do krevního řečiště a způsobují tak reinfekci. Z tohoto důvodu je mnohdy jedinou účinnou léčbou odstranění kolonizovaného zdravotnického materiálu či tkáně (Lebeaux *et al.*, 2014).

Prevence a léčba biofilmových infekcí

Vhledem k tomu, jak obtížné je se biofilmu zbavit, je vhodné tomuto problému předcházet. A to zejména dodržováním hygienických postupů, používáním sterilních ochranných prostředků a prováděním daných postupů zaškoleným personálem. Další z možností je antibiotická profylaxe během operace, kdy se antibiotika podávají těsně před incizí, a to zejména u ortopedických a srdečních operací. Další variantou jsou antibiotické nátěry implantátů, které tak zajistí vysokou koncentraci antibiotik přímo v místě potřeby. Pokud nic z toho nezabere a biofilm se přesto vytvoří, bývá často nezbytné uchýlit se k odstranění kontaminovaného materiálu, anebo odstranění poškozené tkáně (Lebeaux *et al.*, 2014).

Tyto výše zmíněné postupy spadají do kategorie nespecifických postupů, které necílí přímo na bakterie v biofilmu. Nicméně existují pokusy, které se zaměřují přímo na biofilm. Jde například o využití rekombinantních fágů, které působí nejen proti bakteriím, ale jsou také schopni ničit EPS. Dále to je použití quorum sensing inhibitorů, které by zamezili mezibuněčné komunikaci a tím tvorbě biofilmu. Nebo se uvažuje o využití nanočástic. Existují pokusy, které studují použití křemičitých nanočástic jako prevenci proti tvorbě biofilmů obsahující *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Pseudomonas araguinosa* a *Candida albicans*. Nebo třeba nanočástice, které jsou schopny generovat volné radikály, které mají antimikrobiální efekt (Samal a Das, 2018).

3.5 Biofilm a Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus patří mezi nozokomiální bakterie osidlující lidské tělo a způsobující různá infekční onemocnění, od infekcí kůže a měkkých tkání až po život ohrožující septické stavy. Spolu se *Staphylococcus epidermidis* pak patří mezi nejčastější

původce infekcí spojených s tvorbou biofilmu na zdravotnických pomůckách. Bakterie *S. aureus* jsou díky biofilmu chráněny před účinky antibiotik, a to je spolu se zvýšenou antibiotickou rezistencí jednou z příčin zvýšené mortality u těchto infekcí (Schilcher a Horswill, 2020).

Obdobně jako ostatní bakterie má stafylokokový biofilm podobné složení, tj. mikrokolonie buněk obklopené extracelulární polymerní substancí. Bylo zjištěno, že hlavní složkou stafylokokového EPS je polysacharidový intracelulární adhezín, jež hraje důležitou roli v kolonizaci povrchů a formaci biofilmu. EPS se dále skládá z řady různých proteinů. Je to například protein Aap, který napomáhá maturaci biofilmu, fibronektin vázající proteiny FnBP A a B nebo třeba protein vázající extracelulární matrix Embp (Idrees *et al.*, 2021).

Stejně jako ostatní buněčné procesy, tak i tvorba biofilmu je geneticky kódována. V případě *Staphylococcus aureus* bylo identifikováno hlavních 12 genů zodpovědných za formaci biofilmu. Jsou to tyto geny: fibrinogen-binding proteins (*fib*) gene, fibronectin-binding proteins gene (*fnbA* a *fnbB*) genes, intercellular adhesion (*icaA*, *B*, *C* a *D*) genes, clumping factor (*clfA* a *clfB*), elastin binding protein (*ebps*), laminin binding protein (*eno*) and collagen binding protein (*cna*) gene. Jejich funkce je popsána v Tabulce 1. Tyto geny pak můžeme využít na PCR detekci, pro zjištění, zda vybrané kmeny mají potenciál tvořit biofilm (Idrees *et al.*, 2021).

Tabulka 1. Přehled genů *S. aureus* zodpovědných za formaci biofilmu a jejich funkcí (Idrees *et al.*, 2021).

Geny	Funkce
<i>fib</i>	rozpoznávání povrchových proteinů
<i>icaABCD</i>	adherence, mezibuněčné propojení
<i>fnbAB</i>	invaze hostitelské buňky
<i>eps, eno</i>	kolonizace

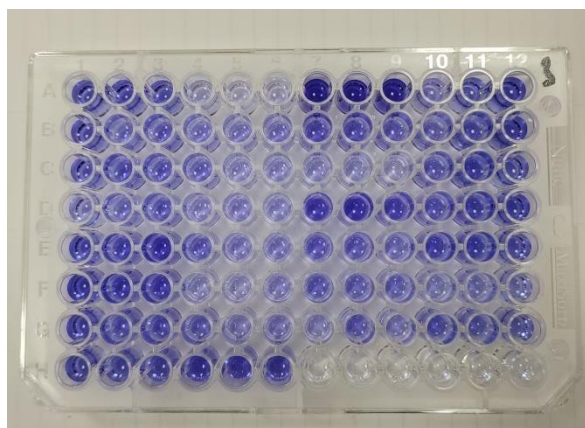
4 Detekce biofilmu

Existuje několik způsobů, jak detekovat biofilm. Tyto metody můžeme rozdělit na fenotypové a genotypové. V případě fenotypových metod se zaměřujeme na kultivaci bakterií, jejich následné obarvení a pozorování nebo na metabolickou aktivitu.

Genetické metody využívají možnosti průkazu genů odpovědných pro tvorbu biofilmu pomocí PCR, mohou to být například geny *icaABCD* kódující intercelulární adheziny (Idrees *et al.*, 2021).

4.1 Christensenova metoda

Jednou z klasických metod pro detekci biofilmu je Christensenova metoda. Může probíhat buď ve zkumavce nebo v mikrotitračních destičkách. Principem metody je kultivace bakterií v tekutém médiu a následné obarvení narostlého biofilmu, například krystalovou violetí nebo karbolfuchsinem. U zkumavkové metody jsou zkumavky po inkubaci promyty a poté se hodnotí obarvená vrstva biofilmu na stěně zkumavky. Biofilm pozitivní bakterie vykazují silně patrnou obarvenou vrstvu po celé stěně zkumavky. U biofilm negativních zůstává zkumavka nezbarvená. V případě kultivace na mikrotitračních destičkách dochází k odečtu výsledků spektrofotometricky (Knobloch *et al.*, 2002). Biofilm obarvený v mikrotitrační destičce je zobrazený na Obrázku 2.



Obrázek 2. Christensenova metoda detekce biofilmu v mikrotitrační destičce (vlastní zdroj).

4.2 Kultivace na agaru s kongo červení

Tato metoda je založena na použití pevné kultivační půdy s přidáním kongo červení. Toto barvivo interaguje s extracelulárními polysacharidy v biofilmu. Pokud jsou bakterie biofilm pozitivní tak po kultivaci, která trvá 24 až 48 hodin, dochází k nárůstu kolonií,

které mají černou barvu a suchý, matný vzhled. Viz Obrázek 3. Popřípadě jsou jako pozitivní hodnoceny i černohnědé kolonie s výraznou precipitační zónou. V případě biofilm negativních bakterií jsou kolonie červené, hladké a lesklé. Nevýhodou této metody je její výrazná subjektivita a nízká specifita (Knobloch *et al.*, 2002).

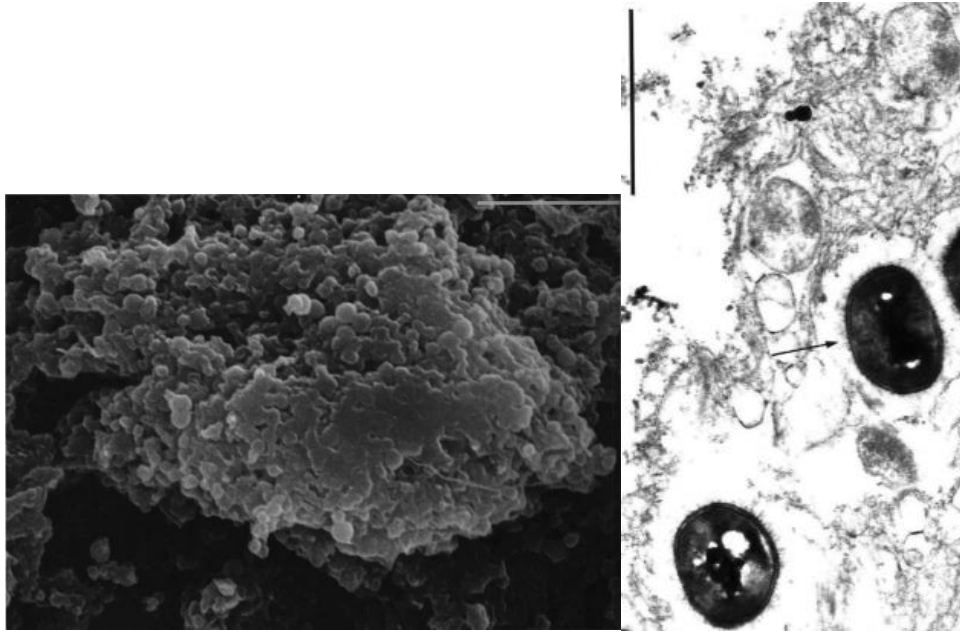


Obrázek 3. Kolonie *Staphylococcus epidermidis* na agaru s kongo červení, černé, suché kolonie – biofilmpozitivní kmen, červené, hladké kolonie – biofilmnegativní kmeny (Holá, 2017).

4.3 Mikroskopické metody

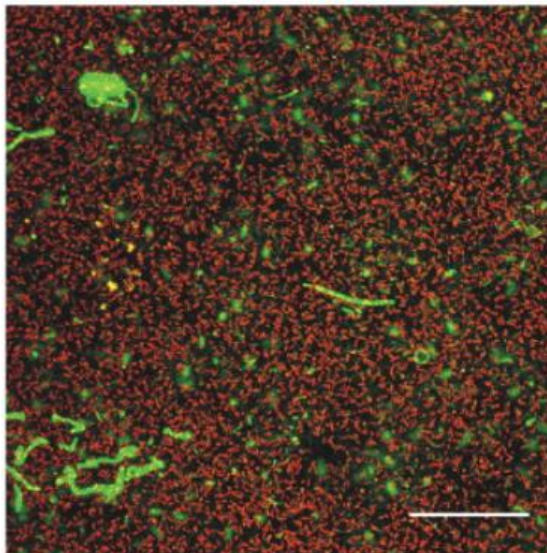
K pozorování biofilmu lze využít i různé mikroskopické techniky. Světelná mikroskopie je nejjednodušší metodou pro zobrazení biofilmu. Barvením (např. kombinací Gramova barvení a alcianové modři) můžeme zvýraznit jak jednotlivé buňky, tak různé extracelulární struktury (Foster, 1996).

Dále lze využít elektronovou mikroskopii, která umožňuje detailní zobrazení jednotlivých buněk. Skenovací elektronový mikroskop se často používá k pozorování povrchu biofilmu, zatímco transmisní elektronová mikroskopie umožňuje pohled na vnitřní struktury (Idrees *et al.*, 2021). Biofilm zobrazený pomocí elektronového mikroskopu lze vidět na Obrázku 4.



Obrázek 4. Biofilm tvořený bakteriemi *S. aureus* zobrazený pomocí skenovací elektronové mikroskopie (nalevo) a transmisní elektronové mikroskopie (napravo) (Archer *et al.*, 2011).

Fluorescenční mikroskopie umožňuje zobrazit biofilm pomocí fluorescenčních barviv. Pomocí nich můžeme pozorovat nejenom jednotlivé složky biofilmu, ale i biologické procesy, jak jsou buněčné interakce nebo růstová aktivita. Velice výhodnou metodou pro pozorování biofilmu je konfokální mikroskopie, které umožňuje zobrazit 3D strukturu. Zároveň to je nedestruktivní metoda, která může probíhat i *in situ* (Idrees *et al.*, 2021). Příklad takto zobrazeného biofilmu je na Obrázku 5.



Obrázek 5. Vizualizace biofilmu pomocí fluorescenčního konfokálního mikroskopu (Wagner *et al.*, 2009).

4.4 Metabolické metody

Ke stanovení množství biofilmu může využít fyziologické procesy bakterií, přesněji sledování metabolické přeměny barviv na stanovitelné deriváty. Mezi nejčastěji používané metody patří redukce tetrazolinových solí a resazurinu (Pettit *et al.*, 2009).

Tetrazolinové soli se používají jako indikátory buněčného dýchání. Jednou z takto používaných sloučenin je XTT (2,3-bis-(2-metyloxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5 karboxanilid). Tato látka se s buňkách redukuje na barevnou sloučeninu formazan, kterou pak můžeme spektrofotometricky kvantifikovat. Nevýhodou této metody, je že bakterie mohou XTT metabolizovat různou rychlostí a měření tak nemusí být zcela přesné (Kuhn *et al.*, 2003).

Další metodou je redukce resazurinu. Toto barvivo má ve svém oxidovaném stavu modrou barvu a při jeho redukcí metabolicky aktivními buňkami dochází k přeměně na růžový fluoreskující resorufin. Jako hladinu pak můžeme stanovovat buď fluorimetricky nebo spektrofotometricky. Výhodou použití resazurinu je jeho stabilita, nulová toxicita a rychlost sledované reakce (Pettit *et al.*, 2009).

4.5 Genetické metody

Pro průkaz přítomnosti genů, která jsou typické pro tvorbu biofilmu je vhodná polymerázová řetězová reakce (PCR). Tato metoda však není vhodná pro kvantifikaci, neboť dochází k amplifikaci živých i mrtvých buněk biofilmu. Tomuto problému se lze vyhnout použitím kvantitativní reverzně transkripční PCR. Tato metoda využívá amplifikaci bakteriální mRNA, která má krátkou životnost a lépe tak koreluje s počtem živých buněk (Pantanella *et al.*, 2013).

K detekci biofilmu se dá také využít fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Tato metoda využívá oligonukleotidové sondy značené fluorescenčními barvivy. Tyto sondy se vážou na rRNA, která je obzvláště přítomná v životaschopných buňkách. FISH také umožňuje detektovat obtížně kultivovatelné bakterie a bakterie s nízkou úrovní metabolismu. V kombinaci s konfokální laserovou mikroskopií pak lze zobrazit topografickou mapu vícedruhového biofilmu (Pantanella *et al.*, 2013).

5 Cíle práce

Cílem je zjistit korelaci míry tvorby biofilmu u klinických kmenů *Staphylococcus aureus* z ran získaných od pacientů chirurgického oddělení ve Fakultní nemocnici u sv. Anny v Brně v roce 2023 pomocí klasických kultivačních metod a detekcí vybraných genů asociovaných s tvorbou biofilmu u druhu *S. aureus* metodou Real-Time PCR.

Výzkumné otázky:

- Tvoří sesbírané klinické kmeny *Staphylococcus aureus* biofilm?
- Do jaké míry koreluje tvorba biofilmu zjištěná pomocí klasických kultivačních metod s přítomností genů pro tvorbu biofilmu?

6 Materiál a metody

6.1 Materiál

6.1.1 Chemikálie

- Destilovaná voda (technický úsek Mikrobiologického ústavu FN u sv. Anny v Brně)
- Sterilní fyziologický roztok (technický úsek Mikrobiologického ústavu FN u sv. Anny v Brně)
složení: 9 g/l NaCl a destilovaná voda
- Trypton-sójový agar (Oxoid, UK)
- Fosfátový pufr (PBS) (Penta, Česká republika)
složení: 800 ml destilovaná voda; 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄; pH roztoku upraveno na hodnotu 7,4 pomocí HCl.
- Trypton-sójový bujón CM 0129 (TSB) (Oxoid, UK)
složení: 17 g/l hydrolyzát kaseinu, 3 g/l hydrolyzát sóje, 5 g/l NaCl, 2,5 g/l Na₂HPO₄, 2,5 g/l glukóza, 4 g/l agar, 1000 ml destilovaná voda
- Krystalová violet[®] – solutio GRAM, modifikace podle Nowy připravená dle Prescriptions Reagentium (Fakultní lékárna u sv. Anny v Brně)
- kyselina octová (Penta, Česká republika)
- LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche, Švýcarsko)
Master Mix, H₂O PCR
- primery, viz Tabulka 2 (Eurofins Genomics, Německo)
- NucleoMag[®] Dx Pathogen - kit pro izolaci DNA (Takara Bio, USA)

Všechna kultivační média byla připravena v technickém úseku Mikrobiologického ústavu FN u sv. Anny v Brně dle standardních operačních postupů.

6.1.2 Použité kmeny

Pro sledování tvorby biofilmu byly použité kmeny *Staphylococcus aureus* izolované z různých klinických vzorků pocházejících od pacientů z chirurgického oddělení FN u sv. Anny v Brně v rámci mikrobiologického vyšetření na Mikrobiologickém ústavu fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně. Celkem bylo testováno 94 kmenů.

6.1.3 Přístroje a pomůcky

- mini centrifuga Zephyrus® (Elisabeth pharmacon, UK)
- centrifuga 5430 (Eppendorf, Německo)
- multifunkční modulární reader INFINITE M NANO (Tecan Trading, Švýcarsko)
- biohazard box Class II Type A2 (Esco Labculture®, Singapur)
- vortex (Labnet International, Inc., USA)
- denzitometr DENSI-LA-METER II (Erba Lachema s.r.o., ČR)
- hlubokomrazicí box Lexicon ULT Freezer (ESCO, USA)
- mikrotitrační destičky P pro tkáňové kultury s 96 jamkami s plochým dnem (Gama Group, CZ)
- kit pro izolaci nukleových kyselin KingFisher 96 Accesory Kit A (Macherey-Nagel, USA)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection Systém (Bio-Rad, USA)
- KingFisher™ Flex Purification System (ThermoFisher Scientific, USA)

6.2 Metody

Pro veškerou následující práci bylo kultivováno všech 94 kmenů *S. aureus* na kultivačních miskách s trypton-sojovým agarem. Očkování na misky proběhlo ze zamrazených bakteriálních suspenzí, uskladněných při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve sbírce mikroorganismů Mikrobiologického ústavu FN u sv. Anny v Brně, kultivace probíhala 24 hodin při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2.1 Testování schopnosti stafylokoků tvořit biofilm pomocí Christensenovy metody

Pro ověření schopnosti tvořit biofilm vybranými kmeny *S. aureus* byla využita metoda barvení krystalovou violetí dle Christensena.

Do sterilní zkumavky, pro každý kmen jedna zkumavka, bylo napipetováno 2 ml PBS a následně kličkou přidán bakteriální kmen, a to až do vytvoření suspenze o optické densitě 0,5 McFarlandova standardu. Tato suspenze byla poté pipetována po 20 μ l do mikrotitračních destiček s plochým dnem. K této suspenzi bylo potom do každé jamky přidáno 180 μ l TBS s 1 % glukózy. Každý kmen byl napipetován v triplicátu a testování proběhlo ve třech nezávislých opakováních. Do 6 jamek destičky bylo dále napipetováno 20 μ l PBS a 180 μ l TBS s 1 % glukózou. Tyto jamky sloužily jako negativní kontrola. Destičky se pak byly inkubovány 24 hodin při 37 °C.

Po kultivaci byly destičky promyty. Suspenze byla odsáta a biofilm byl třikrát promyt fyziologickým roztokem a následně byly destičky sušeny v termostatu při 37 °C.

Následující den proběhlo barvení destiček krystalovou violetí dle Christensena. Do každé jamky bylo pipetováno 200 μ l krystalové violeti, která byla ponechána v jamkách na 15 minut při laboratorní teplotě. Po uplynulé době byla krystalová violet' odsáta a destičky byly promývány pod tekoucí vodou, dokud z nich viditelně vystupovalo barvivo. V dalším kroku bylo do destiček napipetováno 200 μ l 33% kyseliny octové a opět proběhla 15minutová inkubace při laboratorní teplotě. Po 15 minutách proběhlo měření absorbance na multifunkčním modulárním reader INFINITE M NANO při vlnové délce 595 nm.

Vyhodnocení výsledků bylo upraveno dle Stepanoviće *et al.* (2006). Z hodnot negativní kontroly byla získána průměrná optická densita (OD) a vypočítaná její směrodatná odchylka (SD). Hraniční hodnota (cut-off) pro hodnocení biofilm pozitivních vzorků (ODc) byla vypočítána následovně:

$$ODc = OD \text{ negativní kontroly} + 3 \times SD \text{ OD negativní kontroly}$$

Zprůměrováním naměřených hodnot optické denzity každého testovaného kmene byla vypočítána optická densita pro testovaný kmen (ODtk). Kmeny pak byly rozřazeny do 4 kategorií, dle schopnosti tvořit biofilm.

Kmeny netvořící biofilm:	$OD_{tk} \leq OD_c$
Kmeny slabě tvořící biofilm:	$OD_c < OD_{tk} \leq 4 \times OD_c$
Kmeny středně tvořící biofilm:	$4 \times OD_c < OD_{tk} \leq 8 \times OD_c$
Kmeny silně tvořící biofilm:	$8 \times OD_c < OD_{tk}$

6.2.2 Průkaz přítomnosti genů pro tvorbu biofilmu pomocí Real-time PCR

Pro provedení PCR bylo nutné nejprve izolovat DNA. Do sterilních zkumavek, pro každý kmen jedna zkumavka, bylo pipetováno 2 ml TSB a kličkou nanášeny bakteriální kultury. Zkumavky byly inkubovány 24 hodin při 37 °C. Po kultivaci byly buňky centrifugovány a promyty pomocí PBS, a to celkem třikrát. 200 µl buněk každého kmene bylo pipetováno do 96 jamkové destičky pro izolaci nukleových kyselin. Destičky byly vloženy do přístroje KingFisher a izolace probíhala podle instrukcí výrobce. Principem metody je adsorpce makromolekul DNA na magnetické kuličky. Ty jsou poté promyty dvěma různými pufrými a ethanolem, následně jsou sušeny proudem vzduchu a v posledním kroku je DNA eluována do roztoku. Izolovaná DNA byla uchovávána při -80 °C:

PCR se prováděla celkem pro 3 vybrané geny: *clfA*, *fnbA* a *fnbB*. Sekvence primerů byly převzaty od Shivaee *et al.* (2019) a jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2. Sekvence použitých primerů.

Primer	Sekvence (5'-3')
<i>clfA</i>	F: TACAAGTGC GCCTAGAATGA R: TTTGACATAACCTGCTTGGT
<i>fnbA</i>	F: TGAAGGTGGTTATGTTGATG R: CAGTGTATCCTCCAACATGA
<i>fnbB</i>	F: GTAGAGGAAAGTGGGAGTTCAG R: TGTGTTGATTGTGATGGTTGC

Příprava reakční směsi pro PCR probíhala v biohazard boxu. Vyizolovaná DNA, spolu s LightCycler® 480 SYBR Green I Master (skládající se z připraveného Master mix a PCR vody) a primery byly rozmrazeny na chladicí destičce při 4 °C. Všechny zkumavky s reagensii byly před použitím zvortexovány a krátce stočeny. Do přichystané PCR destičky pak byly reagensie napipetovány podle rozpisu v Tabulce 3.

Tabulka 3. Složení PCR směsi.

Složení PCR směsi	Objem (μ l)
PCR voda	2 μ l
SYBR Green I Master	5 μ l
Primer forward	1 μ l
Primer reverse	1 μ l
DNA matrice	1 μ l
Celkový objem směsi	10 μ l

Destička s přichystanými vzorky pak byla přelepena fólií a krátce zcentrifugována. Samotná Real-time PCR pak proběhla na přístroji CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) podle reakčního profilu, viz Tabulka 4.

Tabulka 4. Reakční profil Real-time PCR.

Krok	Fáze	Počet cyklů	Teplota	Čas
1	udržovací fáze	1	95 °C	5:00 min
2	denaturace		95 °C	0:10 sec
3	annealing	40	60 °C	0:10 sec
4	elongace		72 °C	0:12 sec
5	denaturace	1	95 °C	0:05 sec
6	křivka tání	1	65–97 °C	0:05 sec
7	chlazení	1	40 °C	0:10 sec

Jako pozitivně detekovaný gen byl označen takový, kdy hodnota měřené fluorescence pro daný gen překročila prahovou hodnotu před dosažením 35. cyklu. Specifita PCR produktů byla ověřena pomocí vyhodnocení profilu křivky tání.

6.3 Statistické vyhodnocení

Závislost míry tvorby biofilmu u klinických kmenů *S. aureus* na detekovaných genech asociovaných s tvorbou biofilmu metodou Real-Time PCR byla vyhodnocena pomocí Pearsonova chí-kvadrát testu nezávislosti. Zvolená hladina významnosti byla $\alpha = 0,05$. Statistická analýza byla zpracována pomocí on-line nástroje Applied Statistics In Healthcare Research – Multi-way Contingency Table Chi-Square Analysis (Montelpare *et al.*, 2024)

7 Výsledky

7.1 Výsledky testování schopnosti stafylokoků tvořit biofilm pomocí Christensenovy metody

Nejprve byla z naměřených hodnot absorbance negativní kontroly vypočítána průměrná optická denzita (OD), dále její směrodatná odchylka (SD) a hraniční hodnota pro pozitivitu (OD_c; cut off).

- OD = 0,345
- SD = 0,055
- OD_c = 0,508

Z naměřených hodnot absorbance pak byly následně vypočítány optické hodnoty pro každý testovaný kmen (OD_{tk}), se směrodatnou odchylkou pro testované kmeny (SD_{tk}) SD_{tk} = 1,900, viz Tabulka 5.

Podle vypočítaných hodnot OD_{tk} pak byly testované kmeny rozděleny do 4 kategorií dle schopnosti tvořit biofilm: kmeny netvořící biofilm, kmeny slabě tvořící biofilm, kmeny se střední schopností tvořit biofilm a kmeny se silnou produkcí biofilmu. Rozmezí hodnot jednotlivých kategorií je zobrazeno v Tabulce 6.

Tabulka 5. Kategorizace míry tvorby biofilmu na základně měření Christensenovou metodou.

Kategorie míry tvorby biofilmu	
Netvoří	OD _{tk} ≤ 0,508
Slabá	OD _c < OD _{tk} ≤ 2,033
Střední	2,033 < OD _{tk} ≤ 4,065
Silná	4,065 < OD _{tk}

Tabulka 6. Výsledky měření míry tvorby biofilmu Christensenovou metodu vyjádřené pomocí optické denzity pro jednotlivé testované kmeny. Modře jsou zobrazeny kmeny se slabou produkcí biofilmu, zeleně se středně silnou produkcí biofilmu a oranžově se slabou produkcí biofilmu.

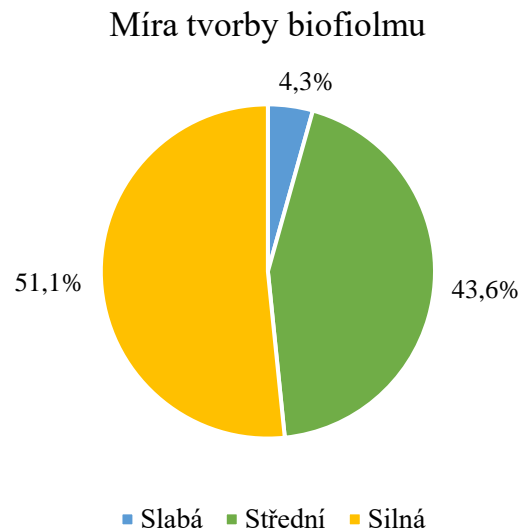
Kmen	ODtk	Kmen	ODtk	Kmen	ODtk	Kmen	ODtk
AS3-23-1	5,278	AS-23-25	5,125	AS-23-49	3,423	AS-23-73	4,485
AS3-23-2	4,975	AS-23-26	5,289	AS-23-50	2,766	AS-23-74	2,369
AS3-23-3	6,519	AS-23-27	2,927	AS-23-51	4,494	AS-23-75	3,002
AS3-23-4	4,165	AS-23-28	2,380	AS-23-52	4,244	AS-23-76	5,023
AS3-23-5	7,208	AS-23-29	2,351	AS-23-53	2,414	AS-23-77	3,016
AS3-23-6	4,868	AS-23-30	2,521	AS-23-54	9,295	AS-23-78	1,977
AS3-23-7	3,534	AS-23-31	4,153	AS-23-55	9,171	AS-23-79	5,570
AS3-23-8	4,328	AS-23-32	6,811	AS-23-56	5,422	AS-23-80	3,839
AS3-23-9	3,050	AS-23-33	2,082	AS-23-57	2,922	AS-23-81	5,919
AS3-23-10	3,511	AS-23-34	2,077	AS-23-58	2,984	AS-23-82	2,687
AS3-23-11	7,416	AS-23-35	6,968	AS-23-59	5,152	AS-23-83	3,251
AS3-23-12	7,101	AS-23-36	3,571	AS-23-60	4,727	AS-23-84	4,182
AS3-23-13	6,451	AS-23-37	2,903	AS-23-61	1,869	AS-23-85	5,757
AS3-23-14	6,223	AS-23-38	4,650	AS-23-62	3,678	AS-23-86	2,112
AS3-23-15	6,355	AS-23-39	2,803	AS-23-63	3,221	AS-23-87	3,646
AS3-23-16	6,588	AS-23-40	2,208	AS-23-64	5,020	AS-23-88	2,395
AS3-23-17	3,948	AS-23-41	4,444	AS-23-65	3,907	AS-23-89	4,701
AS3-23-18	5,794	AS-23-42	6,100	AS-23-66	1,477	AS-23-90	2,397
AS3-23-19	7,597	AS-23-43	5,029	AS-23-67	12,126	AS-23-91	2,649
AS3-23-20	7,185	AS-23-44	6,783	AS-23-68	3,754	AS-23-92	3,926
AS3-23-21	1,505	AS-23-45	2,220	AS-23-69	3,217	AS-23-93	3,797
AS3-23-22	4,956	AS-23-46	5,498	AS-23-70	2,571	AS-23-94	5,302
AS3-23-23	4,168	AS-23-47	7,213	AS-23-71	3,988		
AS3-23-24	2,864	AS-23-48	5,046	AS-23-72	3,563		

Rozdělení kmenů dle míry tvorby biofilmu podle vytvořených kategorií je zobrazeno v následující Tabulce č. 7. Všechny testované kmeny tvořily biofilm s různou intenzitou. Celkem 49 kmenů bylo silnými producenty biofilmu, dalších 41 kmenů produkovali biofilm středně silně a 4 kmeny tvořily biofilm slabě.

Tabulka 7. Rozdělení testovaných kmenů podle míry tvorby biofilmu na základě měření Christensenovou metodou (absolutní počty).

Míra tvorby biofilmu	
Netvoří	0
Slabá	4
Střední	41
Silná	49
Celkový počet kmenů	94

Rozložení výsledku v procentním podílu je znázorněno na Obrázku 6. Kde je vidět, že silní producenti biofilmu tvořily 51,1 % z celkového množství testovaných kmenů, středně silní producenti tvořily 43,6 % a 4,3 % tvořili slabí producenti biofilmu.



Obrázek 6. Graf rozdělení testovaných kmenů podle míry tvorby biofilmu na základě měření Christensenovou metodou (v procentech). Modře jsou zobrazeny kmeny se slabou produkcí biofilmu, zeleně se středně silnou produkcí biofilmu a oranžově se silnou produkcí biofilmu.

7.2 Výsledky detekce genů pro tvorbu biofilmu testovaných kmenů stafylokoků pomocí Real-time PCR

Schopnost tvorby biofilmu vybraných kmenů *S. aureus* byla testována pro 3 vybrané geny: *clfA*, *fnbA*, *fnbB*. Výsledek byl hodnocen jako pozitivní (POZ) nebo negativní (NEG). Gen *clfA* byl nalezen pozitivní u 89 kmenů, gen *fnbA* u 92 kmenů a gen *fnbB* u 82 kmenů. Výsledky jsou zobrazeny v Tabulce 8.

Tabulka 8. Výsledky detekce genů pro tvorbu biofilmu testovaných kmenů stafylokoků pomocí Real-time PCR.

Kmen	<i>clfA</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	Kmen	<i>clfA</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	Kmen	<i>clfA</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>
AS-23-1	POZ	POZ	NEG	AS-23-33	POZ	POZ	NEG	AS-23-65	POZ	POZ	POZ
AS-23-2	POZ	POZ	NEG	AS-23-34	POZ	POZ	POZ	AS-23-66	POZ	POZ	NEG
AS-23-3	POZ	POZ	POZ	AS-23-35	POZ	POZ	POZ	AS-23-67	POZ	POZ	POZ
AS-23-4	POZ	POZ	POZ	AS-23-36	POZ	POZ	POZ	AS-23-68	POZ	POZ	POZ
AS-23-5	POZ	POZ	POZ	AS-23-37	POZ	POZ	POZ	AS-23-69	POZ	POZ	POZ
AS-23-6	POZ	POZ	POZ	AS-23-38	POZ	POZ	POZ	AS-23-70	POZ	POZ	NEG
AS-23-7	POZ	POZ	POZ	AS-23-39	POZ	POZ	POZ	AS-23-71	POZ	POZ	POZ
AS-23-8	POZ	POZ	POZ	AS-23-40	POZ	POZ	POZ	AS-23-72	POZ	POZ	POZ
AS-23-9	POZ	POZ	NEG	AS-23-41	POZ	POZ	POZ	AS-23-73	POZ	POZ	POZ
AS-23-10	POZ	POZ	POZ	AS-23-42	POZ	POZ	POZ	AS-23-74	POZ	POZ	POZ
AS-23-11	POZ	POZ	POZ	AS-23-43	POZ	POZ	POZ	AS-23-75	POZ	POZ	POZ
AS-23-12	POZ	POZ	POZ	AS-23-44	POZ	POZ	POZ	AS-23-76	POZ	POZ	POZ
AS-23-13	POZ	POZ	POZ	AS-23-45	POZ	POZ	POZ	AS-23-77	POZ	POZ	POZ
AS-23-14	POZ	POZ	POZ	AS-23-46	POZ	POZ	POZ	AS-23-78	POZ	POZ	POZ
AS-23-15	POZ	POZ	POZ	AS-23-47	POZ	POZ	POZ	AS-23-79	POZ	POZ	POZ
AS-23-16	POZ	POZ	POZ	AS-23-48	POZ	POZ	POZ	AS-23-80	NEG	POZ	POZ
AS-23-17	POZ	NEG	POZ	AS-23-49	POZ	POZ	POZ	AS-23-81	POZ	POZ	POZ
AS-23-18	POZ	POZ	POZ	AS-23-50	POZ	POZ	POZ	AS-23-82	POZ	POZ	POZ
AS-23-19	POZ	POZ	POZ	AS-23-51	POZ	POZ	POZ	AS-23-83	POZ	POZ	POZ
AS-23-20	POZ	POZ	NEG	AS-23-52	POZ	POZ	POZ	AS-23-84	POZ	POZ	POZ
AS-23-21	POZ	POZ	NEG	AS-23-53	POZ	POZ	POZ	AS-23-85	NEG	POZ	POZ
AS-23-22	POZ	POZ	POZ	AS-23-54	POZ	POZ	POZ	AS-23-86	NEG	POZ	POZ
AS-23-23	POZ	POZ	POZ	AS-23-55	POZ	POZ	POZ	AS-23-87	POZ	POZ	POZ
AS-23-24	POZ	POZ	POZ	AS-23-56	POZ	POZ	POZ	AS-23-88	POZ	POZ	NEG
AS-23-25	POZ	POZ	POZ	AS-23-57	POZ	POZ	POZ	AS-23-89	POZ	POZ	POZ
AS-23-26	POZ	POZ	POZ	AS-23-58	POZ	POZ	NEG	AS-23-90	POZ	POZ	POZ
AS-23-27	POZ	POZ	POZ	AS-23-59	POZ	POZ	POZ	AS-23-91	POZ	POZ	POZ
AS-23-28	POZ	POZ	POZ	AS-23-60	POZ	POZ	POZ	AS-23-92	NEG	POZ	POZ
AS-23-29	POZ	POZ	POZ	AS-23-61	NEG	NEG	NEG	AS-23-93	POZ	POZ	POZ
AS-23-30	POZ	POZ	POZ	AS-23-62	POZ	POZ	POZ	AS-23-94	POZ	POZ	POZ
AS-23-31	POZ	POZ	NEG	AS-23-63	POZ	POZ	POZ				
AS-23-32	POZ	POZ	POZ	AS-23-64	POZ	POZ	POZ				

7.3 Porovnání Christensenovy metody a Real-time PCR

V Tabulce 9. jsou porovnány výsledky testování míry tvorby biofilmu pomocí Christensenovy metody a výsledků detekce genů metodou Real-time PCR.

Tabulka 9. Porovnání míry tvorby biofilmu testovaných kmenů a detekce genů pro tvorbu biofilmu pomocí Real-time PCR. Modře jsou zobrazeny kmeny se slabou produkcí biofilmu, zeleně se středně silnou produkcí biofilmu a oranžově se silnou produkcí biofilmu.

Kmen	ODtk	<i>clfA</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	Kmen	ODtk	<i>clfA</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	Kmen	ODtk	<i>clfA</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>
AS-23-1	5,278	POZ	POZ	NEG	AS-23-33	2,082	POZ	POZ	NEG	AS-23-65	5,046	POZ	POZ	POZ
AS-23-2	4,975	POZ	POZ	NEG	AS-23-34	2,077	POZ	POZ	POZ	AS-23-66	3,423	POZ	POZ	NEG
AS-23-3	6,519	POZ	POZ	POZ	AS-23-35	6,968	POZ	POZ	POZ	AS-23-67	3,907	POZ	POZ	POZ
AS-23-4	4,165	POZ	POZ	POZ	AS-23-36	3,571	POZ	POZ	POZ	AS-23-68	1,477	POZ	POZ	POZ
AS-23-5	7,208	POZ	POZ	POZ	AS-23-37	2,903	POZ	POZ	POZ	AS-23-69	12,126	POZ	POZ	POZ
AS-23-6	4,868	POZ	POZ	POZ	AS-23-38	4,650	POZ	POZ	POZ	AS-23-70	3,754	POZ	POZ	NEG
AS-23-7	3,534	POZ	POZ	POZ	AS-23-39	2,803	POZ	POZ	POZ	AS-23-71	3,217	POZ	POZ	POZ
AS-23-8	4,328	POZ	POZ	POZ	AS-23-40	2,208	POZ	POZ	POZ	AS-23-72	2,571	POZ	POZ	POZ
AS-23-9	3,050	POZ	POZ	NEG	AS-23-41	4,444	POZ	POZ	POZ	AS-23-73	3,988	POZ	POZ	POZ
AS-23-10	3,511	POZ	POZ	POZ	AS-23-42	6,100	POZ	POZ	POZ	AS-23-74	3,563	POZ	POZ	POZ
AS-23-11	7,416	POZ	POZ	POZ	AS-23-43	5,029	POZ	POZ	POZ	AS-23-75	4,485	POZ	POZ	POZ
AS-23-12	7,101	POZ	POZ	POZ	AS-23-44	6,783	POZ	POZ	POZ	AS-23-76	2,369	POZ	POZ	POZ
AS-23-13	6,451	POZ	POZ	POZ	AS-23-45	2,220	POZ	POZ	POZ	AS-23-77	3,002	POZ	POZ	POZ
AS-23-14	6,223	POZ	POZ	POZ	AS-23-46	5,498	POZ	POZ	POZ	AS-23-78	5,023	POZ	POZ	POZ
AS-23-15	6,355	POZ	POZ	POZ	AS-23-47	7,213	POZ	POZ	POZ	AS-23-79	3,016	POZ	POZ	POZ
AS-23-16	6,588	POZ	POZ	POZ	AS-23-48	5,046	POZ	POZ	POZ	AS-23-80	1,977	NEG	POZ	POZ
AS-23-17	3,948	POZ	NEG	POZ	AS-23-49	3,423	POZ	POZ	POZ	AS-23-81	5,570	POZ	POZ	POZ
AS-23-18	5,794	POZ	POZ	POZ	AS-23-50	2,766	POZ	POZ	POZ	AS-23-82	3,839	POZ	POZ	POZ
AS-23-19	7,597	POZ	POZ	POZ	AS-23-51	4,494	POZ	POZ	POZ	AS-23-83	5,919	POZ	POZ	POZ
AS-23-20	7,185	POZ	POZ	NEG	AS-23-52	4,244	POZ	POZ	POZ	AS-23-84	2,687	POZ	POZ	POZ
AS-23-21	1,505	POZ	POZ	NEG	AS-23-53	2,414	POZ	POZ	POZ	AS-23-85	3,251	NEG	POZ	POZ
AS-23-22	4,956	POZ	POZ	POZ	AS-23-54	9,295	POZ	POZ	POZ	AS-23-86	4,182	NEG	POZ	POZ
AS-23-23	4,168	POZ	POZ	POZ	AS-23-55	9,171	POZ	POZ	POZ	AS-23-87	5,757	POZ	POZ	POZ
AS-23-24	2,864	POZ	POZ	POZ	AS-23-56	5,422	POZ	POZ	POZ	AS-23-88	2,112	POZ	POZ	NEG
AS-23-25	5,125	POZ	POZ	POZ	AS-23-57	2,922	POZ	POZ	POZ	AS-23-89	3,646	POZ	POZ	POZ
AS-23-26	5,289	POZ	POZ	POZ	AS-23-58	2,984	POZ	POZ	NEG	AS-23-90	2,395	POZ	POZ	POZ
AS-23-27	2,927	POZ	POZ	POZ	AS-23-59	5,152	POZ	POZ	POZ	AS-23-91	4,701	POZ	POZ	POZ
AS-23-28	2,380	POZ	POZ	POZ	AS-23-60	4,727	POZ	POZ	POZ	AS-23-92	2,397	NEG	POZ	POZ
AS-23-29	2,351	POZ	POZ	POZ	AS-23-61	1,869	NEG	NEG	NEG	AS-23-93	2,649	POZ	POZ	POZ
AS-23-30	2,521	POZ	POZ	POZ	AS-23-62	3,678	POZ	POZ	POZ	AS-23-94	3,926	POZ	POZ	POZ
AS-23-31	4,153	POZ	POZ	NEG	AS-23-63	3,221	POZ	POZ	POZ					
AS-23-32	6,811	POZ	POZ	POZ	AS-23-64	5,020	POZ	POZ	POZ					

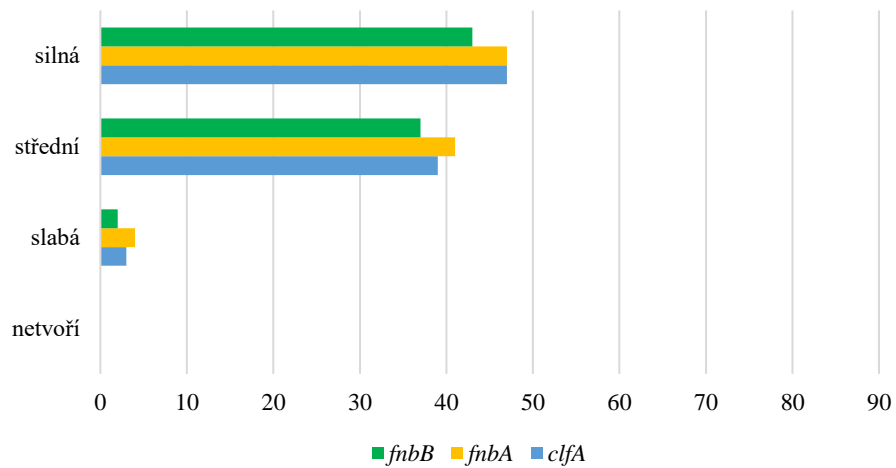
U všech testovaných kmenů byla pomocí Christensenovy metody zjištěna schopnost tvorby biofilmu, a to v různé intenzitě, nejvíce však byla zastoupena kategorie silný růst biofilmu (51,1 % kmenů). Ze tří testovaných genů asociovaných s tvorbou biofilmu – *clfA*, *fnbA* a *fnbB*, byl nejčastěji detekován gen *fnbA*. Z 94 kmenů byl tento gen identifikován u 92 kmenů (97,9 %). Za přítomnosti tohoto genu 49 kmenů tvořilo biofilm silně, 40 středně silně a 3 kmeny vykazovaly slabou tvorbu biofilmu. Gen *clfA*, který byl přítomen u 89 kmenů (94,6 %). Za přítomnosti tohoto genu 48 vykazovalo silnou tvorbu biofilmu, 39 středně silnou tvorbu biofilmu a v kategorii slabá to byly 2 kmeny. Nejméně často detekovaný byl gen *fnbB*, který byl detekován u 82 kmenů (87,2 %). Za přítomnosti tohoto genu 45 kmenů bylo v kategorii se silnou tvorbou biofilmu, 35 v kategorii středně silná tvorba biofilmu a slabou tvorbu biofilmu pak vykazovaly 2 testované kmeny. Shrnutí výsledků lze vidět v Tabulce 10 a pro přehlednější znázornění i na obrázku 7.

Závislost míry tvorby biofilmu u klinických kmenů *S. aureus* na detekovaných genech asociovaných s tvorbou biofilmu metodou Real-Time PCR byla statisticky vyhodnocena. Na zvolené hladině významnosti nebyla nalezena souvislost mezi přítomností konkrétních genů pro tvorbu biofilmu a mírou jednotlivých kmenů tvořit biofilm ($p > 0,05$).

Tabulka 10. Porovnání schopnosti tvorby biofilmu s vybranými geny. Na zvolené hladině významnosti nebyla nalezena souvislost mezi přítomností konkrétních genů pro tvorbu biofilmu a mírou jednotlivých kmenů tvořit biofilm ($p > 0,05$).

		Geny asociované s tvorbou biofilmu		
		<i>clfA</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>
Míra tvorby biofilmu	netvoří	0	0	0
	slabá	2	3	2
	střední	39	40	35
	silná	48	49	45
Celkový počet kmenů		89	92	82

Porovnání míry tvorby biofilmu



Obrázek 7. Graf zobrazující porovnání míry tvorby biofilmu testovaných kmenů a detekované geny pro tvorbu biofilmu pomocí Real-time PCR. Na zvolené hladině významnosti nebyla nalezena souvislost mezi přítomností konkrétních genů pro tvorbu biofilmu a mírou jednotlivých kmenů tvořit biofilm ($p > 0,05$).

8 Diskuze

Staphylococcus aureus je významný patogen, který způsobuje celou řadu různých onemocnění, a to od kožních infekcí až po chronické systémové infekce. Tvorba biofilmu činí bakterie odolnějšími, a to jak vůči imunitnímu systému pacienta, tak i léčbě antibiotiky. Infekce asociované s biofilmem pak mají nejen významný negativní dopad na zdraví pacienta, ale představují také vysokou socioekonomickou zátěž (Manandhar *et al.*, 2018). Je tedy důležité umět biofilm detekovat. V této práci byly k detekci využity dvě metody. Christensenova metoda a genetická detekce pomocí Real-time PCR.

Jaké první způsob detekce byla využita Christensenova metoda barvení biofilmu pomocí krystalové violeti, tato metoda kvantifikuje tvorbu biofilmu zpravidla v mikrotitračních destičkách a je považována za „zlatý standard“ detekce biofilmu. V této práci bylo vyhodnocení upraveno dle Stepanoviče (Stepanović *et al.*, 2006), které je založeno na vypočítání průměrných optických hodnot negativní kontroly a vzorků, dále vypočítání hraniční hodnoty pro hodnocení biofilm pozitivních vzorků a následně vytvoření škály, která hodnotí biofilm dle síly růstu, a to na kategorie: kmeny netvořící biofilm, slabě tvořící biofilm, středně silně tvořící biofilm a kmeny silně tvořící biofilm. Na tomto základně pak bylo zjištěno, že všechny z 94 testovaných kmenů tvořily biofilm různou silnou. Žádný testovaný kmen nebyl označený jako biofilm neprodukující. 4 (4,3 %) kmeny prokazovaly slabý růst biofilmu, 41 (43,6 %) kmenů tvořilo biofilm středně silně a 49 (51,1 %) kmenů bylo silnými producenty biofilmu.

Na rozdíl od předkládané práce, byly ve většině studií zaměřených na tvorbu biofilmu u klinických izolátů *S. aureus* identifikovány i kmeny, které biofilm neprodukují. Neopane *et al.* v roce 2018 provedli výzkum, ve kterém ze 43 kmenů *S. aureus* izolovaných z ran z různých částí těla, byla produkce biofilmu zjištěna u 30 kmenů (69,8 %). Z těchto 30 kmenů jich pak 6,97 % produkovalo silný biofilm, 27,90 % středně silný biofilm a 34,88 % produkovalo biofilm slabě. Dále pak Moghadam *et al.* (2014) ve své studii 65 kmenů *S. aureus* izolovaných ze stěrů z ran z kůže a měkkých tkáních zjistili, že 15 % izolátů biofilm neprodukuje vůbec a zbývající kmeny byly rozřazeny následovně: 20 % slabá, 44 % střední a 21 % silná produkce biofilmu. Dále Khandan Del *et al.* (2019) zkoumali 60 nemocničních izolátů *S. aureus*, který byly sesbírány z ran, mozkomíšního moku, moči, abscesů a ascitů. Z těchto vzorků pak bylo 47 (78,3 %) identifikováno jako biofilm produkující a zbylých 13 (21,7 %) kmenů biofilm netvořilo. Tato studie

zároveň ukazuje, že ze 47 biofilm pozitivních kmenů, jich je 30 (63,9 %) silnými a 17 (36,1 %) slabými producenty biofilmu. Zmiňují také, že nepozorovali žádnou zjevnou korelaci mezi zdrojem bakterií, pohlavím pacienta a potenciálem tvořit biofilm.

Existují ovšem i studie, u kterých byly všechny kmeny pomocí Christensenovy metody identifikovány jako biofilm produkující, tedy podobně jako v této práci. Například Xu *et al.* ve své studii z roku 2016 zkoumal 257 nemocničních izolátů *S. aureus*, jejichž původ nebyl v jejich práci specifikován a zjistili, že 77,1 % z nich tvořilo slabý, 22,6 % středně silný a 2,3 % silný biofilm. Další práce (Ebert *et al.*, 2021) testovala 47 kmenů izolovaných od pacientů s oseteomyelitidou a u všech byla také prokázána tvorba biofilmu v různé míře. Slabých producentů bylo 26 %, středně silných bylo 40 % a silných pak bylo 34 % kmenů.

Tyto odlišné výsledky mohou být ovlivněny různými environmentálními faktory, jako je například datum odběru vzorku, teplota nebo snížený obsah kyslíku. Důležitým faktorem také může být to, zda pacient podstupoval antibiotickou léčbu a jaké konkrétní antibiotikum užíval. Dále může mít na tvorbu biofilmu i místo, odkud byl vzorek odebrán (Gangwar *et al.*, 2020; Reiter *et al.*, 2011). Tvorbu biofilmu může také ovlivnit složení použitého média. Zatímco glukóza a jiné sacharidy růst biofilmu podporují, zvýšené množství NaCl nebo příliš vysoké či nízké pH může růst biofilmu potlačit (Tang *et al.*, 2012).

Druhá část této práce byla zaměřena na identifikaci genů asociovaných s tvorbou biofilmu. Konkrétně se jednalo o geny *clfA*, *fnbA* a *fnbB*. Gen *clfA* (clumping faktor) kóduje povrchový protein, který váže fibrinogen a mění jej na fibrin, který pak podporuje shlukování bakteriálních buněk. Geny *fnbA* a *fnbB* (fibronektin vázající proteiny) jsou pak odpovědné za tvorbu produktů, které jsou nezbytné pro invazi a adhezi bakterií. Všechny tyto geny jsou důležité pro adhezi a tvorbu biofilmu (Acheh *et al.*, 2020; Azmi *et al.*, 2019).

V předkládané práci bylo pomocí Real-time PCR zjištěno, že z 94 testovaných kmenů se gen *clfA* vyskytoval u 89 kmenů (94,6 %), gen *fnbA* byl zjištěn u 92 kmenů (97,9 %) a gen *fnbB* byl zastoupený v nejmenší míře, a to u 82 kmenů (87,2 %).

Alabbosh *et al.* (2023) ve své práci hledali geny asociované s tvorbou biofilmu ve 24 klinických vzorcích *S. aureus* izolovaných z ran. Gen *clfA* byl identifikován u 54,2 %

kmenů, *fnbA* u 37,5 % a *fnbB* u 41,7 %. Tyto geny zkoumal také Mohammadi (*et al.*, 2020), procentuální zastoupení genů v 83 vzorcích izolovaných z ran bylo následovné: *clfA* 50,6 %, *fnbA* 42,1 % a *fnbB* 12 %. Dále Azmi *et al.* (2019) ve své práci hledali biofilm asociované geny v 248 klinických vzorcích *S. aureus*. Tyto vzorky byly odebrány z ran (78), krevních kultur (34), nosních sekretů (25), moči (23) a dalších nespécifikovaných míst původu (88). Z těchto všech izolátů byl gen *clfA* identifikován u 80,2 %, *fnbA* u 78,2 % a *fnbB* u 29,0 % kmenů.

Ani jedna z uvedených publikací, zcela neodpovídá výsledkům této práce, ale ani publikace mezi sebou nevykazují shodu a zastoupení genů je vždy odlišné. Důležitým faktorem ovlivňujícím tvorbu biofilmu může být rozdílná míra exprese jednotlivých genů. Síla genové exprese, se pak může projevit různě, v závislosti na procesu vývoje biofilmu, rychlosti růstu buněk, nebo třeba jejich velikosti (Idrees *et al.*, 2021). Beenken *et al.* (2004) ve svém výzkumu uvádí, že exprese genu *clfA* byla nejvyšší ve stacionární fázi, zatímco geny *fnbA* a *fnbB* byly nejvíce exprimovány během fáze exponenciální.

V této práci byly položeny dvě výzkumné otázky, na které bych ráda odpověděla.

- Tvoří sesbírané klinické kmeny *Staphylococcus aureus* biofilm?
- Do jaké míry koreluje tvorba biofilmu zjištěná pomocí klasických kultivačních metod s přítomností genů pro tvorbu biofilmu?

Pomocí Christensenovy metody bylo zjištěno, že všechny testované kmeny tvoří biofilm, a to v různé míře. Většina (51,1 %) byla dokonce silnými producenty biofilmu. Molekulární testování pak ukázalo, že ne všechny kmeny obsahovaly požadované geny (*clfA*, *fnbA*, *fnbB*). Přestože u většiny kmenů byly identifikovány všechny 3 hledané geny, tak u některých kmenů byly přítomné pouze 2 geny. A pouze u jednoho kmene (č. 61) nebyl detekován žádný ze tří hledaných genů. Tento kmen byl zároveň slabým producentem biofilmu. Dalo by se tedy usoudit, že přestože se zde nenacházel ani jeden z hledaných genů, mohl se zde nacházet jiný gen asociovaný s tvorbou biofilmu. Dále nebyla nalezena souvislost mezi přítomností konkrétních genů pro tvorbu biofilmu a mírou jednotlivých kmenů tvořit biofilm ($p > 0,05$).

K podobným závěrům došel Ghaioumy *et al.* (2021), kdy zkoumali souvislost genů *icaABCD* a míru produkce biofilmu. Jejich testované kmeny byly negativní na přítomnost těchto genů, ale i tak vykazovaly různě silný růst biofilmu a navrhují, že přítomnost nebo

absence genů *icaABCD* není spolehlivým ukazatelem pro rozlišení schopnosti izolátů *S. aureus* tvořit biofilm a tvorba biofilmu může být ovlivněna jinými geny.

Další, kdo se tomuto tématu věnoval byl Jones *et al.* (2022). I v této práci byly identifikovány kmeny, které biofilm v různé míře produkovaly, ale nebyl detekován žádný z hledaných genů. Navrhuje pak, že produkce biofilmu může být ovlivněna místem původu izolátu, metabolickou aktivitou, stresovými faktory nebo imunitním systémem hostitele.

Z uvedeného tedy vyplývá, že prostá schopnost tvorby biofilmu a dále různá míra tvorby biofilmu jsou závislé nejen na přítomnosti jednotlivých genů asociovaných s touto vlastností, ale také na úrovni exprese daných genů a další faktorech, které na bakteriální buňky působí.

9 Závěr

Tato práce byla zaměřena na detekci tvorby biofilmu klinickými kmeny bakterie *Staphylococcus aureus* pomocí Christensenovy metody a dále průkazem přítomnosti genů asociovaných s tvorbou biofilmu. Byly k tomu vybrány dvě metody.

Christensenova metoda barvení krystalovou violetí ukázala, že všechny testované kmeny biofilm tvoří, a to v různé míře. Nejvíce byla zastoupená kategorie silný růst biofilmu (51,1 %), dále 43,6 % kmenů tvořilo biofilm středně silně a 4,3 % kmenů vykazovaly slabou tvorbu biofilmu.

Metodou Real-time PCR byly testovány tři vybrané geny asociované s tvorbou biofilmu u *S. aureus*: *clfA*, *fnbA*, *fnbB*. Bylo zjištěno, že všechny testované kmeny obsahují 2–3 z těchto genů, kromě jednoho vzorku, u kterého nebyl detekován ani jeden gen. Ačkoliv tedy bylo potvrzeno, že všechny izoláty jsou schopné produkce biofilmu, nebyla nalezena statisticky významná souvislost mezi přítomností jednotlivých genů a mírou produkce biofilmu.

Pro další výzkum by mohlo být vhodné pomocí Real-time PCR detekovat i další geny, stanovit míru exprese jednotlivých genů nebo se zaměřit na různé environmentální faktory a jejich vliv na tvorbu biofilmu.

10 Seznam použitých zdrojů

ACHEK, R., HOTZEL, H., NABI, I., 2020. Phenotypic and Molecular Detection of Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Isolated from Different Sources in Algeria. *Pathogens*. 9(2). ISSN 2076-0817. Dostupné z: doi:10.3390/pathogens9020153

ALABBOSH, KF., ZMANTAR, T., BAZAID, AS., SNOUSSI, M., NOUMI, E., 2023. Antibiotics Resistance and Adhesive Properties of Clinical *Staphylococcus aureus* Isolated from Wound Infections. *Microorganisms*. 11(5). ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms11051353

ARCHER, NK., MAZAITIS, MJ., COSTERTON, JW., LEID, JG., POWERS, ME., SHIRTLIFF, ME., 2014. *Staphylococcus aureus* biofilms. *Virulence*. 2(5), 445-459. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.4161/viru.2.5.17724

AZMI, K., QREI, W., ABDEEN, Z., 2019. Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm production in methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus* isolated from Palestinian patients. *BMC Genomics*. 20(1). ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-019-5929-1

BEEKEN, KE., DUNMANN, PM., MCALEESE, F., MACAPAGAL, D., MURPHY, E., PROJAN, SJ., BLEVINS, JS., SMELTZER, MS., 2004. Global Gene Expression in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Journal of Bacteriology*. 186(14), 4665-4684. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.186.14.4665-4684.2004

COSTERTON, JW., GEESEY, GG., CHENG, KJ., 1978. How Bacteria Stick. *Scientific American*. 238(1), 86-95. ISSN 0036-8733. Dostupné z: doi:10.1038/scientificamerican0178-86

DAVID, MZ., DAUM, RS., 2017. Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 409, 325-383. ISBN 978-3-319-72061-6. Dostupné z: doi:10.1007/82_2017_42

DONLAN, RM., 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 8(9), 881-890. ISSN 1080-6040. Dostupné z: doi:10.3201/eid0809.020063

DUFOUR, D., LEUNG, V., CÉLINE M., LÉVESQUE, M., 2010. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*. 22(1), 2-16. ISSN 1601-1538. Dostupné z: doi:10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x

EBERT, C., TUCHSCHERR, L., UNGER, N., PÖLLATH, Ch., GLADIGAU, F., POPP, J., LÖFFLER, B., NEUGEBAUER, U., 2021. Correlation of crystal violet biofilm test results of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with Raman spectroscopic read-out. *Journal of Raman Spectroscopy*. 52(12), 2660-2670. ISSN 0377-0486. Dostupné z: doi:10.1002/jrs.6237

ESTEBAN, J., MOLINA-MANSO, D., SPILIOPOULOU, I., CORDERO-AMPUERO, J., FERNÁNDEZ-ROBLAS, R., FOKA, A., GÓMEZ-BARRENA, E., 2010. Biofilm development by clinical isolates of *Staphylococcus* spp. from retrieved orthopedic prostheses. *Acta Orthopaedica*. 81(6), 674-679. ISSN 1745-3674. Dostupné z: doi:10.3109/17453674.2010.537810

European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of Infectious Diseases. Online. In. ecdc.europa.eu. Dostupné z: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>. [citováno 2024-04-6].

FOSTER, T., 1996. In: *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, ISBN 0-9631172-1-1.

FOSTER, T., 2002. *Molecular Medical Microbiology*, 2n edition. Academic press, ISBN 9780126775303.

GANGWAR, B., KUMAR, S., DAROKAR, MP., 2020. Glabridin Averts Biofilms Formation in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Modulation of the Surfaceome. *Frontiers in Microbiology*. 11. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2020.01779

GHAIOUMY, R., TABATABAEIFAR, F., MOZAFARINIA, K., ARABI MIANROODI, A., ISAEI, E., MORONES-RAMÍREZ, JR., AGHA KUCHAK AFSHARI, S., KALANTAR-NEYESTANAKI, D., 2021. Biofilm formation and molecular analysis of intercellular adhesion gene cluster (icaABCD) among *Staphylococcus aureus* strains isolated from children with adenoiditis. *Iranian Journal of Microbiology*. 13(4), 458-463. ISSN 2008-4447. Dostupné z: doi:10.18502/ijm.v13i4.6969

GHELLAI, L., HASSAINE, H., KLOUCHE, N., KHADIR, A., AISSAOUI, N., NAS, F., ZINGG, W., 2014. Detection of biofilm formation of a collection of fifty strains of *Staphylococcus aureus* isolated in Algeria at the University Hospital of Tlemcen. *Journal of Bacteriology Research*. 6(1), 1-6. ISSN 2006-9871. Dostupné z: doi:10.5897/JBR2013.0122

GONZÁLEZ, JE., KESHAVAN, ND., 2006. Messing with Bacterial Quorum Sensing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70(4), 859-875. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.00002-06

GOWRISHANKAR, S., KAMALADEVI, A., BALAMURUGAN, K., Karutha PANDIAN, S., 2016 In Vitro and In Vivo Biofilm Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Patients Associated with Pharyngitis Infection. *BioMed Research International*. 2016, 1-14. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2016/1289157

GUO, Y., SONG, G., SUN, M., WANG, J., WANG, Y., 2020. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020-3-17, 10. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2020.00107

HAAG, AF., FITZGERALD, JR., PENADÉS, JR., 2019. *Staphylococcus aureus* in Animals. *Microbiology Spectrum*. 7(3). ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0060-2019

HABALOVÁ, K., ŽEMLIČKOVÁ, H., 2017. Meticilin rezistentní stafylokoky: přehled terapie a antibiotická rezistence. *Remedia*. 27(5), 502-505. ISSN 0862-8947.

HOLÁ, V., 2007. *Metody průkazu tvorby biofilmu u lékařsky významných mikrobuů*. Brno. Disertační práce. LF MU.

HURYCH, J., ŠTÍCHA, R., 2021. *Lékařská mikrobiologie*. 3. vydání. Praha: Triton 637 s. ISBN 9788075539762

IDREES, M., SAWANT, S., KARODIA, N., RAHMAN, A., 2021. *Staphylococcus aureus* Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 18(14). ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph18147602

JIANG, Q., CHEN J., YANG, Ch., YIN Y., YAO, K., 2019. Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases. *BioMed Research International*. 2019-04-04, 1-15. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2019/2015978

JONES, SU., KEE, BP., CHEW, CHH., YEO, CH., ABDULLAH, FH., OTHMAN, N., CHUA, KH., PUAH, SM., 2022. Phenotypic and molecular detection of biofilm formation in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Malaysia. *Journal of Taibah University for Science*. 16(1), 1142-1150. ISSN 1658-3655. Dostupné z: doi:10.1080/16583655.2022.2147387

KHANDAN DEL, A., KABOOSI, H., JAMALLI, A., PEYRAVII GHADIKOLAI, F., 2019. Prevalence and Expression of PSM A Gene in Biofilm-Producing *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 12(8). ISSN 2008-3645. Dostupné z: doi:10.5812/jjm.89610

KNOBLOCH, J., HORSTKOTTE, M., ROHDE, H., MACK, D, 2002. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*. 191(2), 101-106. ISSN 0300-8584. Dostupné z: doi:10.1007/s00430-002-0124-3

KUHN, DM., BALKIS, M., CHANDRA, J., MUKHERJEE, PK., GHANNOUM, MA., 2003. Uses and Limitations of the XTT Assay in Studies of *Candida* Growth and Metabolism. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(1), 506-508. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.41.1.506-508.2003

LAMRET, F., COLIN, M., MONGARET, C., GANGLOFF, SC., REFFUVEILLE, F., 2020. Antibiotic Tolerance of *Staphylococcus aureus* Biofilm in Periprosthetic Joint Infections and Antibiofilm Strategies. *Antibiotics*. 9(9). ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics9090547

LEBEAUX, D., GHIGO, JM., BELOIN, CH., 2014. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 78(3), 510-543. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.00013-14

MANANDHAR, S., SINGH, A., VARMA, A., PANDEY, S., SHRIVASTAVA N., 2018. Biofilm Producing Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates Augmented Prevalence of Antibiotic Resistant Cases in Tertiary Care Hospitals of Nepal. *Frontiers in Microbiology*. 2018-11-27, 9., 9:2749. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2018.02749

MISSIAKAS, DM., SCHNEEWIND, O., 2013. Growth and Laboratory Maintenance of *Staphylococcus aureus*. *Current Protocols in Microbiology*. 28(1). ISSN 1934-8525. Dostupné z: doi:10.1002/9780471729259.mc09c01s28

MOGHADAM, OS., POURMAND, MR., AMINHARATI, F., 2014. Biofilm formation and antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from burn patients, Iran. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 8(12), 1511-1517. ISSN 1972-2680. Dostupné z: doi:10.3855/jidc.5514

MOHAMMADI, A., GOUDARZI, M., DADASHI, M., SOLTANI, M., GOUDARZI H., HAJIKHANI, B., 2020. Molecular Detection of Genes Involved in Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Strains Isolates: Evidence From Shahid Motahari Hospital in Tehran. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 13(7). ISSN 2008-3645. Dostupné z: doi:10.5812/jjm.102058

MONTELPARE W., READ, E., MCCOMBER, T., MAHAR, A., RITCHIE, K., 2020. Applied Statistics in Healthcare Research. Online. In: pressbooks.library.upei.ca. Dostupné z: <https://pressbooks.library.upei.ca/montelpare/>. [citováno 2024-04-17].

NEOPANE, P., NEPAL, HP., SHRESTHA, R., UEHARA, O., ABIKO, Y., 2018. In vitro biofilm formation by emStaphylococcus aureus/em isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. *International Journal of General Medicine*. 11, 25-32. ISSN 1178-7074. Dostupné z: doi:10.2147/IJGM.S153268

PANTANELLA, F., VALENTI, P., NATALIZI, T., PASSERI, D., BERLUTTI, F., 2013. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig*. 25(1), 31-42. Dostupné z: doi: 10.7416/ai.2013.1904

PETTIT, RK., WEBER CHA., PETTIT, GR., 2009. Application of a high throughput Alamar blue biofilm susceptibility assay to Staphylococcus aureus biofilms. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 8(1). ISSN 1476-0711. Dostupné z: doi:10.1186/1476-0711-8-28

REITER, KC., DA SILVA PAIM, TG., DE OLIVEIRA, CF., D'AZEVEDO, PA., 2011. High biofilm production by invasive multiresistant staphylococci. *APMIS*. 119(11), 776-781. ISSN 09034641. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0463.2011.02807.x

SAMAL, S., DAS PK., 2018. Microbial Biofilms: Pathogenicity and Treatment Strategies. *Pharmatutor*. 6(1), 16-22. ISSN 2347-7881. Dostupné z: doi:10.29161/PT.v6.i1.2018.16

SCHILCHER, K., HORSWILL, AR., 2020. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 84(3), e00026-19 [cit. 2024-03-08]. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.00026-19

SHIVAE, A., KALANI, BS., TALEBI, M., DARBAN-SAROHALIL S., 2019. Does biofilm formation have different pathways in Staphylococcus aureus? *Iran J Basic Med Sci*. 22(10), 1147–1152. Dostupné z: doi: 10.7416/ai.2013.1904

SRINIVASAN, R., SANTHAKUMARI, S., POONGUZHALI, P., GEETHA, M., DYAVAI AH, M., XIANGMIN, L., 2021. Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. *Frontiers in Microbiology*. 2021-5-12, 12. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2021.676458

STEPANOVIĆ, S., VUKOVIĆ, D., HOLÁ, V., DI BONAVENTURA, G., DJUKIĆ, S., ČIRKOVIĆ, I., RŮŽIČKA, F., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 115(8), 891-899. ISSN 0903-4641. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm630.x

TANG, J., CHEN, J., LIU, J., ZHANG, R., YANG, R., CHEN, L., 2012. Effects of different cultivation conditions on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and diversity of adhesin genes. *Journal of Food Safety*. 2(32), 210-218. ISSN 1745-4565. Dostupné z: doi:10.1111/j.1745-4565.2012.00370.x

VERDEROSA, AD., TOTSIKA, M., FAIRFULL-SMITH, KE., 2019. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Frontiers in Chemistry*. 2019-11-28, 7. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2019.00824

VESTBY, LK., GRØNSETH, T., SIMM, R., NESSE, LL., 2020. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics*. 9(2). ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics9020059

VOTAVA, M., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun 495 s. ISBN 80-902896-6-5

VOTAVA, M., 2010. *Lékařská mikrobiologie – vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7

WAGNER, M., IVLEVA, NP., HAISCH, Ch., NIESSNER, R., HORN, H., 2009. Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): Investigations on EPS – Matrix. *Water Research*. 43(1), 63-76. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2008.10.034

XU, Z., LIANG, Y., LIN, S., CHEN, D., LI, B., LI, L., DENG, Y., 2016. Crystal Violet and XTT Assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm Quantification. *Current Microbiology*. 73(4), 474-482. ISSN 0343-8651. Dostupné z: doi:10.1007/s00284-016-1081-1

ZHAO, X., YU, Z., DING, T., 2020. Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Microorganisms*. 8(3). ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms8030425

11 Seznam obrázků

Obrázek 1. Fáze tvorby biofilmu (Srinivasan <i>et al.</i> , 2021), upraveno.....	15
Obrázek 2. Christensenova metoda detekci biofilmu v mikrotitrační destičce (vlastní zdroj).....	19
Obrázek 3. Kolonie <i>Staphylococcus epidermidis</i> na agaru s kongo červení, černé, suché kolonie – biofilm pozitivní kmen, červené, hladké kolonie – biofilm negativní kmeny (Holá, 2017).	20
Obrázek 4. Biofilm tvořený bakteriemi <i>S. aureus</i> zobrazený pomocí skenovací elektronové mikroskopie (nalevo) a transmisní elektronové mikroskopie (napravo) (Archer <i>et al.</i> , 2011).	21
Obrázek 5. Vizualizace biofilmu pomocí fluorescenčního konfokálního mikroskopu (Wagner <i>et al.</i> , 2009).	21
Obrázek 6. Graf rozdělení testovaných kmenů podle míry tvorby biofilmu na základně měření Christensenovou metodou (v procentech). Graf 1. Rozdělení testovaných kmenů podle míry tvorby biofilmu na základně měření Christensenovou metodou (v procentech).....	31
Obrázek 7. Graf zobrazující porovnání míry tvorby biofilmu testovaných kmenů a detekované geny pro tvorbu biofilmu pomocí Real-time PCR.....	35

12 Seznam tabulek

Tabulka 1. Přehled genů <i>S. aureus</i> zodpovědných za formaci biofilmu a jejich funkcí (Idrees <i>et al.</i> , 2021).....	18
Tabulka 2. Sekvence použitých primerů.....	27
Tabulka 3. Složení PCR směsi.....	28
Tabulka 4. Reakční profil Real-time PCR.....	28
Tabulka 5. Výsledky měření míry tvorby biofilmu Christensenovou metodu vyjádřené pomocí optické denzity pro jednotlivé testované kmeny.....	30
Tabulka 6. Kategorizace míry tvorby biofilmu na základně měření Christensenovou metodou.....	29
Tabulka 7. Rozdělení testovaných kmenů podle míry tvorby biofilmu na základně měření Christensenovou metodou (absolutní počty).....	30
Tabulka 8. Výsledky detekce genů pro tvorbu biofilmu testovaných kmenů stafylokoků pomocí Real-time PCR.....	32
Tabulka 9. Porovnání míry tvorby biofilmu testovaných kmenů a detekce genů pro tvorbu biofilmu pomocí Real-time PCR.....	33
Tabulka 10. Porovnání schopnosti tvorby biofilmu s vybranými geny.....	34

13 Seznam zkratek

DNA	deoxyribonukleová kyselina
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
mRNA	mediátorová RNA
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální RNA
XTT	2,3-bis-(2-metyloxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5 karboxanilid