Epidemiologie 1-06 19.1.2006 10:07 Str. 23
proLékaře.cz | 5.12.2026

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 55, 2006, č. 1, s. 23–29

Možnosti průkazu tvorby biofilmu v rutinní mikrobiologické praxi

Růžička F., Holá V., Votava M.

Mikrobiologický ústav Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně

Souhrn

Stále častější používání katétrů a umělých implantátů, podávání antibiotik a vysoký počet imunokompromitovaných pacientů patří mezi hlavní příčiny rostoucího významu biofilmových infekcí. Jejich charakteristické rysy, především značná rezistence k antimikrobiálním látkám a tvorba dlouhodobě perzistujících ložisek, komplikují terapii. Proto je pro klinické lékaře znalost přítomnosti tohoto faktoru patogenity cenná a měla by mít vliv na postup při léčbě pacienta. K průkazu schopnosti tvořit biofilm u klinicky významných mikroorganismů je však potřeba dostatečně spolehlivý a citlivý postup, kterého lze použít i v podmínkách běžné mikrobiologické laboratoře. Pro průkaz tohoto faktoru virulence se v současnosti používá široké spektrum vyšetřovacích technik. Vizualizací biofilmu mikroskopickými technikami počínaje přes kultivační průkaz, detekci jeho složek, odhalování fyzikálně-chemických odlišností biofilmpozitivních mikroorganismů ve srovnání s jejich planktonickými formami až po průkaz genů zodpovědných za jeho tvorbu. Vzhledem k omezením jednotlivých metod lze nejlepších výsledků dosáhnout nejlépe jejich vzájemnou kombinací.

Klíčová slova: biofilm – metody průkazu biofilmu – Christensenova zkumavková metoda – agar s kongo červení – kapilární zónová elektroforéza – kapilární izoelektrická fokusace.

Summary

Růžička F., Holá V., Votava M.: Methods for Detection of Biofilm Formation in Routine Microbiological Practice

The increasing use of catheters, artificial implants and antimicrobials as well as high numbers of immunocompromised patients are major causes for concern over biofilm infections. These infections are characterized particularly by high resistance to antimicrobials and formation of persistent foci that may complicate therapy. Therefore, detection of biofilm formation is of high relevance to the clinician and his/her approach to the treatment. Reliable and sensitive methods for detection of this pathogenicity factor in clinically important organisms, suitable for use in routine microbiological laboratories, are needed for this purpose. Currently, a wide array of techniques are available for detection of this virulence factor, such as biofilm visualization by microscopy, culture detection, detection of particular components, detection of physical and chemical differences between biofilm-positive organisms and their planktonic forms and detection of genes responsible for biofilm formation. Since each of these methods has limitations, the best results can be achieved by combining different approaches.

Key words: biofilm – methods for biofilm detection – Christensen's test tube method – Congo red agar – capillary zone electrophoresis – capillary isoelectric focusing

Mikrobiální biofilm a jeho význam v medicíně

Schopnost mikroorganismů tvořit na pevném povrchu přisedlá společenstva byla popsána u mořských mikroorganismů již počátkem dvacátého století [50]. Zjistilo se, že takový způsob života je pro většinu mikroorganismů základním způsobem jejich přirozené existence. Relativně organizovaná, často mnohovrstevná společenstva mikroorganismů, pevně adherující k biologickým či umělým povrchům a obalená extracelulární polymerní matrix, byla později nazvána biofilmem [8]. Díky spolupráci a komunikaci mezi jednotlivými buňkami se biofilm formuje jako relativně složitá struktura s náznaky cirkulačního systému, umožňující výživu a odvod metabolitů v celé vrstvě. Struktura a tvar biofilmu jsou však značně proměnlivé a závisí z velké části na pod-

Epidemiologie 1-06 19.1.2006 10:07 Str. 24
proLékaře.cz | 5.12.2026

mínkách zevního prostředí. Mikroorganismy rostoucí ve formě biofilmu se odlišují svými fyziologickými vlastnostmi od planktonických forem. Růst ve formě biofilmu je pro mikroorganismy výhodný, biofilm pro ně představuje účinnou ochranu před nepříznivými podmínkami zevního prostředí a zároveň usnadňuje vzájemnou kooperaci i výměnu genetických informací [9, 11]. U nás na problematiku biofilmu v medicíně upozornil jako první Schindler [40].

Podmínkou vzniku biofilmu je adheze bakteriálních buněk na pevný povrch. V první fázi tvorby biofilmu tak hrají významnou roli fyzikálněchemické vlastnosti adhezního povrchu i přítomnost faktorů adhezivity, jako jsou fimbrie, lipopolysacharid, bičíky nebo exopolysacharidy a receptory na povrchu mikroorganismů. Po přilnutí mikroorganismů k povrchu následuje fáze „akumulace a maturace biofilmu“, kdy bakterie svým množením a vzájemnou agregací vytvářejí tzv. mikrokolonie. V této fázi zároveň dochází k produkci poměrně velkého množství extracelulární matrix, tvořené z větší části polysacharidy. Na regulaci celého procesu se uplatňují specifické molekuly, umožňující mezibuněčnou komunikaci, např. tzv. quorum sensing systém, reagující na množství bakterií v určitém prostoru. V závěrečné fázi může docházet k uvolňování buněk z biofilmu, a tak k jejich dalšímu šíření [32].

Infekce způsobené bakteriemi rostoucími ve formě biofilmu představují závažný zdravotnický problém. Biofilm, jako významný faktor virulence, nejen usnadňuje bakteriálním buňkám příslušného kmene adhezi a kolonizaci, ale také je chrání před ataky imunitního systému a před účinkem antibiotik. Tvorba obtížně eliminovatelných ložisek a z toho vyplývající dlouhodobé přežívání infekčního agens v hostitelském organismu tak určují charakter biofilmových infekcí [10]. Mezi infekce běžně spojované s tvorbou biofilmu patří např. pseudomonádová pneumonie při cystické fibróze, periodontitida, osteomyelitida (stafylokoky), otitis media (*Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* a další), endokarditida (viridující streptokoky, pneumokoky, enterokoky, stafylokoky), enterobakterie, pseudomonády, kvasinky rodu *Candida* a jiné), prostatitida (*Escherichia coli*) a další [13, 32]. Biofilm se též snadno tvoří na dlouhodobě zavedených katétrech, tracheálních cévkách a na umělých implantátech, jako jsou umělé srdeční chlopně, kardiostimulátory, umělé kloubní náhrady, nitroděložní tělíska apod. Vzrůstající význam biofilmových infekcí v posledních desetiletích je mimo jiné spojen právě se stále častějším používáním těchto umělých implantátů.

Zvláště závažné jsou infekce krevního oběhu, především katétrové sepse a infekční endokarditidy. Nejčastějším izolátem zde bývá *Staphylococcus epidermidis* a další koaguláza negativní stafylokoky (CoNS), dále *S. aureus, P. aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Enterococcus faecalis, E. coli*, kvasinky a další [9, 13, 42]. Některé z těchto bakterií, jako např. CoNS a kandidy, kolonizují kožní a slizniční povrchy a mohou kontaminovat odebírané vzorky. To pak komplikuje interpretaci klinického významu při jejich izolaci z krve. Odpověď na otázku, je-li izolovaný kmen etiologické agens sepse nebo pouhá kontaminanta, není jednoduchá. Pro etiologický význam izolátu svědčí jeho opakovaný záchyt z více různých odběrů a rychlejší pozitivita hemokultury. K posouzení klinického významu izolovaného kmene může pomoci i průkaz schopnosti tvořit biofilm. Bylo prokázáno, že klinicky významné izoláty koagulázanegativních stafylokoků i kvasinek (non-*albicans*) z hemokultur ve srovnání s neinvazivními kmeny mají tento faktor virulence častěji [8, 14, 37, 43]. Průkaz schopnosti tvořit biofilm u klinických izolátů poskytuje lékaři cenné podklady k úvaze o možnostech strategie terapie a o prognóze onemocnění.

Laboratorní průkaz biofilmu

Pro průkaz schopnosti tvořit biofilm a pro sledování jeho fyziologie byla vyvinuta celá řada metod. Ne všechny se však hodí pro použití v rutinní mikrobiologické praxi a ne všechny jsou dostupné pro běžné laboratoře. Obecně lze metody průkazu biofilmu rozdělit na metody genotypové a metody fenotypové. Pomocí genotypových metod obvykle prokazujeme geny zodpovědné za adhezi mikrobiálních buněk k povrchům (*atl*E, *fbe*) nebo geny zodpovědné za syntézu extracelulární matrix (*ica*). Tyto metody však indikují pouze potenciální schopnost tvořit biofilm. Skutečná tvorba biofilmu u vyšetřovaného kmene se prokazuje metodami fenotypovými.

Genotypové metody

Použití molekulárně biologických metod je u většiny mikroorganismů komplikováno poměrně velkým počtem genů, které se mohou na tvorbě biofilmu podílet. U stafylokoků se prokazují geny *ica* operonu, zodpovědné za tvorbu klíčové složky biofilmu – extracelulární polysacharidové substance (EPS), nejčastěji pomocí PCR [14, 18]. Interpretaci výsledků tohoto vyšetření komplikuje skutečnost, že není zřejmé, jsou-li tyto geny skutečně exprimovány a zda vyšetřovaný kmen biofilm skutečně tvoří. Častější výskyt u kmenů způsobujících závažná onemocnění a zároveň nezávislost na zevních podmínkách umožňují použít přítomnost těchto genů jako jedno z kritéé-

Epidemiologie 1-06 19.1.2006 10:07 Str. 25
proLékaře.cz | 5.12.2026

rií klinické významnosti izolovaného kmene. Další geny, které se na tvorbě stafylokokových biofilmů podílejí, jsou geny zodpovědné za primární adhezi k povrchům (gen *atl*E kódující stafylokokový autolysin, gen *fnb* kódující „fibronectin-binding protein“), gen *bap* kódující „biofilm associated protein“, gen *aap* kódující „accumulation associated protein“ a další [36]. Jejich obecný výskyt v širokých stafylokokových populacích omezuje jejich použití v rutinní diagnostice.

U ostatních mikroorganismů, např. u kvasinek, pseudomonád, enterobakterií a enterokoků, nebyly, vzhledem ke složitosti celého procesu, prokázány geny s takovou klíčovou úlohou při tvorbě biofilmu, jakou mají např. geny *ica* operonu u stafylokoků [5, 39, 48]. Molekulárně biologické metody jsou zde využívány spíše k výzkumným účelům. S jejich rozvojem se však otvírají možnosti dalšího využití pro průkaz schopnosti tvořit biofilm, např. využití microarray technik detekujících větší počet genů současně.

Fenotypové metody

Mezi nejčastěji používané fenotypové metody patří postupy prokazující tvorbu biofilmu na stěně kultivační nádoby, např. Christensenova zkumavková metoda, případně její modifikace. Také je možno prokázat schopnost tvorby extracelulární polysacharidové substance (EPS), např. u stafylokoků pomocí kultivace na agaru s kongo červení. Dále je možno k tomuto účelu použít např. mikroskopické techniky a další laboratorní postupy, jako jsou elektromigrační techniky.

Mikroskopie

Pro studium adheze mikroorganismů k vhodnému průhlednému podkladu se používá mikroskopie optická. Extracelulární polysacharidové struktury je možno zvýraznit barvivy, např. alciánovou modří, které se na ně specificky vážou. Byla testována i možnost přímé detekce biofilmu na katétrech pomocí světelné mikroskopie. Část infikovaného katétru byla barvena vhodným barvením, fixována a řezána mikrotomem. Nejlépe se osvědčilo fixovat katétr zamražením a řezat jej na zmrazovacím mikrotomu. Nastávaly však problémy při řezání katétru způsobené jeho pružností (PVC, silikon) či naopak tvrdostí (polypropylen). Zároveň docházelo k odlučování biofilmu od povrchu katétru. Z těchto důvodů, i kvůli pracnosti, není tento způsob přímé detekce biofilmu na klinickém materiálu příliš vhodný pro rutinní vyšetřování [20].

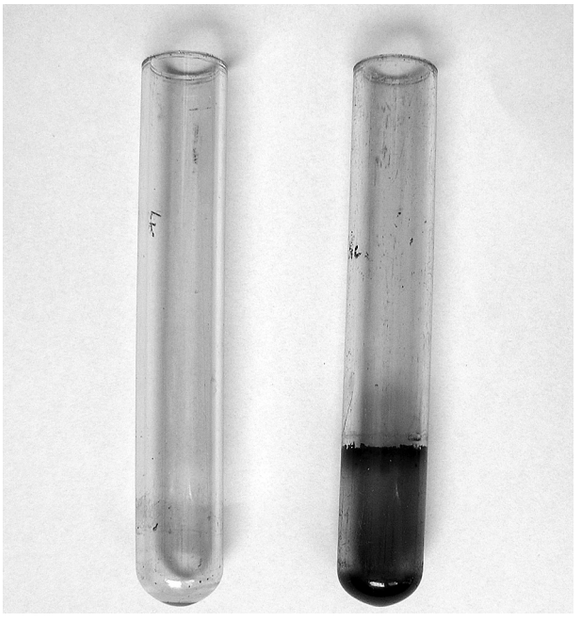
S výhodou může být použita i fluorescenční mikroskopie, např. pro sledování životaschopnosti buněk [31]. Biofilmy o větší tloušťce než 3–4 μm se lépe sledují pomocí konfokální laserové mikroskopie. Tato nedestruktivní metoda nám umožňuje zobrazit průřez biofilmem a pomocí analýzy obrazu rekonstruovat skutečnou trojrozměrnou strukturu [2, 27]. Ke sledování biofilmu a jeho struktury slouží také elektronová mikroskopie. Bohužel, zpracování vzorku je poměrně komplikované a dochází při něm k deformaci struktury biofilmu vinou dehydratace. Výraznou nevýhodou konfokální laserové i elektronové mikroskopie je poměrně vysoká cena přístrojů, která omezuje jejich dostupnost pro běžné rutinní laboratoře.

Christensenova zkumavková metoda

Při Christensenově zkumavkové metodě (Christensen test tube method, CTT) je vyšetřovaný kmen kultivován ve zkumavce obsahující vhodné médium a poté je vrstva biofilmu vytvořená na vnitřní stěně zkumavky prokázána obarvením [6]. Tato metoda je poměrně rozšířená a lze ji použít pro kvalitativní průkaz tvorby biofilmu u celé řady lékařsky významných mikroorganismů tvořících biofilm. S ohledem k nárokům jednotlivých druhů je však nezbytné ji vhodně modifikovat. Zvláštní důraz je potřeba dát na výběr vhodného typu kultivačního povrchu, na použité médium a také na kultivační režim.

Nejčastějším materiálem používaným jako kultivační povrch je sklo a tvrzený polystyren. Díky svým povrchovým vlastnostem se jeví sklo jako vhodnější povrch pro kultivaci stafylokokových biofilmů. Naproti tomu u kvasinek je zase vhodnější použít jako kultivační povrch tvrzený polystyren. Polystyrenový povrch však lze vhodně upravit tak, aby jej bylo možné použít i ke kultivaci stafylokokových biofilmů. Takovou úpravou může být např. sulfonace [19], navázání molekul poly-L-lysinu usnadňující adhezi buněk [29] nebo použití fyzikálních postupů používaných při průmyslové výrobě kultivačních povrchů usnadňující adhezi buněk ve tkáňových kulturách – plazmový výboj ve vakuu [25]. Z dalších materiálů je možno použít např. polypropylen a polyvinylchlorid [17], avšak jejich velkou nevýhodou je neprůhlednost. Volba vhodného kultivačního média rozhodujícím způsobem ovlivňuje úspěšnost této metody. Nejčastěji používanými médii u většiny mikroorganismů jsou bujón z mozkosrdcové infuze nebo tryptonosójový bujón [6, 26], u kvasinek se používá také např. „Yeast Nitrogen Base“ bujón či Sabouraudův bujón [17, 43]. Na tvorbu biofilmu má výrazný vliv obohacení média např. o sacharidy [1, 26] nebo o ionty vápníku či hořčíku [33]. Tvorbu biofilmu zvyšuje i použití stresujících faktorů, jako je ethanol či vyšší koncentrace chloridu sodného [25]. Určitou roli může hrát i složení kultivační atmosféry a dynamické podmínky kultivace [45, 46]. Pro kultivaci se běžně používá teplota 37 °C, u kvasinek též 30 °C. Vhodná doba kultivace se liší podle druhu mikroorganismu. K adhezi

Epidemiologie 1-06 19.1.2006 10:07 Str. 26
proLékaře.cz | 5.12.2026



Obr. 1. Průkaz tvorby biofilmu u *S. epidermidis* Christensenovou zkumavkovou metodou
Biofilmpozitivní kmen *S. epidermidis* (vlevo)
Biofilmnegativní kmen *S. epidermidis* (vpravo)

Fig. 1. Detection of biofilm in *S. epidermidis* by Christensen's test tube method

mikrobiálních buněk na stěnu kultivační nádoby obvykle dochází již v prvních hodinách kultivace a vrstva biofilmu bývá patrná za 6–8 hod. Vyzrálá, dostatečná vrstva biofilmu se vytvoří asi za 18–48 hodin. Delší kultivace není nutná, naopak může docházet až k odlučování biofilmu, vlivem nižší soudržnosti biofilmové vrstvy a pravděpodobně také účinkem regulačních systémů, např. quorum-sensing systému [34].

Promývání zkumavky po skončení kultivace odstraňuje neadherované bakterie. Vrstva biofilmu pevně lpící na vnitřní stěně zkumavky se fixuje, nejlépe sušením nebo Bouinovým roztokem [4], a poté se barví vhodným barvivem – krystalovou violetí, safraninem aj. Výsledek vyšetření je považován za pozitivní, pokud je patrná souvislá vrstva obarveného materiálu adherovaného na stěně zkumavky. Pokud tato vrstva není patrná nebo je přítomen pouze obarvený prstenec v místě hladiny kultivačního média, je výsledek považován za negativní (viz obr. 1). Hodnocení výsledků je bohužel zatíženo značnou subjektivní chybou. Problémy nastávají zvláště při hodnocení výsledků u kmenů slabě tvořících biofilm. Také nedodržení vhodných kultivačních podmínek může vést k falešné negativitě [25].

Kvantitativní průkaz biofilmu kultivací v mikrotitrační destičce

Tato metoda je modifikací výše uvedené CTT, při které se jako kultivační nádoby používají jednotlivé jamky mikrotitrační destičky [7]. Velkou výhodou je zde snazší manipulace i možnost kvantifikace výsledků. Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky je aplikována suspenze vyšetřovaného kmene ve vhodném médiu, poté je destička kultivována, vypláchnuta a obarvena podobně jako v případě CTT. Stejně jako u zkumavkové metody, i zde je nutné pečlivě volit kultivační podmínky, médium i typ povrchu, na kterém má biofilm růst. Výsledek se odečítá pomocí spektrofotometru měřením intenzity zbarvení jamky, která koresponduje s tloušťkou a množstvím narostlé biofilmové vrstvy. Jiným způsobem detekce případně i kvantifikace biofilmu je např. průkaz jeho biochemické aktivity pomocí ATP bioluminiscence [16] nebo použitím kolorimetrických médií. Kolorimetrická média detekují přítomnost životaschopných buněk na základě štěpení sacharidů a vzniku kyselých produktů metabolismu, vedoucích ke změně barvy média [21]. U kvasinek se poměrně často využívá jejich schopnosti redukovat tetrazoliové soli na barevný formazan [17].

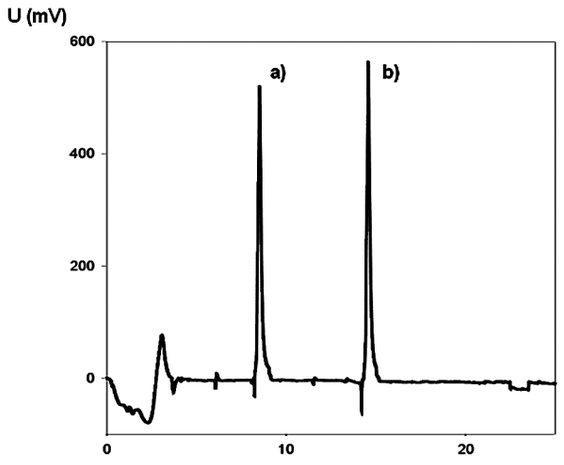
Kultivace na agaru s kongo červení

Kongo červeň je barvivo specificky adherující na polysacharidy. V roce 1989 popsal Freeman et al. metodu umožňující u stafylokoků prokazovat tvorbu extracelulární polysacharidové substance (EPS) na základě charakteristického růstu na agaru obsahující 0,8 % kongočerveně. Výsledek kultivace je hodnocen podle zbarvení a konzistence vyrostlých kolonií. Silní producenti EPS zde rostou v černě pigmentovaných koloniích se suchou krystalickou strukturou. Kmeny bez tvorby slizu vytvářejí červené lesklé kolonie. Kmeny vytvářející lesklé, tmavě pigmentované kolonie, jsou považovány za slabé producenty slizu [15]. Výsledky získané touto metodou však mají pouze orientační hodnotu a odečet výsledků je zatížen značnou subjektivní chybou. Některé kmeny se slabou produkcí EPS se totiž nemusí na této půdě projevit. Na druhou stranu mohou některé kmeny, které netvoří biofilm a ani nemají geny *ica* operonu potřebné pro tvorbu EPS, vytvářet tmavěji pigmentované kolonie [26]. Takové falešně pozitivní výsledky je možno vysvětlit přítomností jiných látek na povrchu buněk vážících kongo červeň. Problémem může být i standardizace přípravy půdy. I malé odchylky při přípravě agaru s kongo červení mohou vést ke změně výsledků, stejně jako použití barviva od jiného výrobce. Na druhou stranu se tato metoda díky jednoduchosti a technické nenáročnosti poměrně často používá v praxi. Je však nutné vzít v úvahu omezenou výpovědní hodnotu tohoto vyšetření.

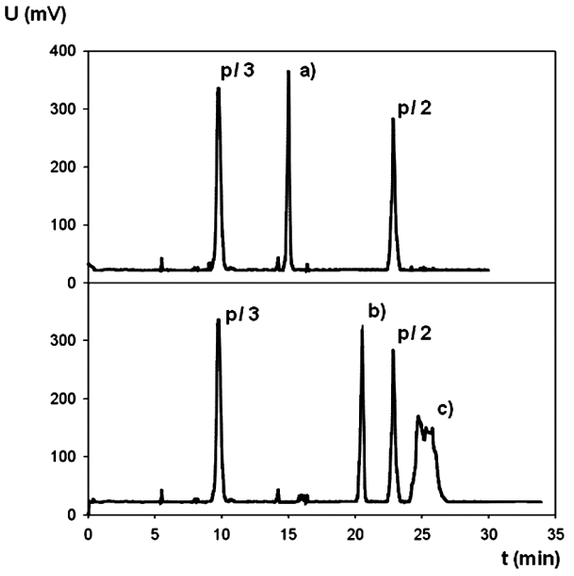
Kapilární elektromigrační techniky

Kapilární elektromigrační techniky [24], sou-

proLékaře.cz | 5.12.2026



Obr. 2. Kapilární zónová elektroforéza dynamicky modifikovaných biofilmpozitivních a biofilmnegativních kmenů *S. epidermidis*.
Separace dynamicky modifikovaných kmenů *S. epidermidis*, biofilmpozitivních (a) a biofilmnegativních (b), v křemenné kapiláře o průměru 0,1 mm; vložené napětí (-) 20 kV; fluorimetrická detekce: λ_{EX} = 335 nm, λ_{EM} = 463;
U – odezva detektoru (mV); t – migrační čas
Fig. 2. Capillary zone electrophoresis of dynamically modified biofilm-positive and biofilm-negative *S. epidermidis* strains



Obr. 3. Kapilární izoelektrická fokusace biofilmpozitivních a biofilmnegativních kmenů *S. epidermidis*
Izoelektrická fokusace kmenů *S. epidermidis*, biofilmpozitivních (a) a biofilmnegativních (b), v křemenné kapiláře o průměru 0,1 mm; vložené napětí (-) 20 kV; fluorimetrická detekce: λ_{EX} = 335 nm, λ_{EM} = 463 nm;
p*I* – markery izoelektrických bodů; U – odezva detektoru (mV); t – migrační čas; c – produkty vzniklé účinkem ultrazvuku na bakterie
Fig. 3. Capillary isoelectric focusing of biofilm-positive and biofilm-negative *S. epidermidis* strains

hrnně označované jako vysokoúčinná kapilární elektroforéza, se často používají k separaci bioanalytů. Pro svou účinnost, citlivost a v neposlední řadě i ekonomičnost provozu, jsou uznávanou a často nezaměnitelnou separační technikou i ve srovnání se značně rozšířenou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. V posledních deseti letech se stále častěji objevují práce, zabývající se separací a detekcí mikroorganismů [3, 12, 41]. K tomuto účelu se obvykle používá kapilární zónová elektroforéza (CZE) nebo kapilární izoelektrické fokusace (CIEF). Při separaci mikroorganismů se využívá odlišnosti jejich povrchových vlastností v různých separačních elektrolytech, rozdílů ve velikosti mikrobů a rozdílnosti jejich povrchového náboje.

Tyto techniky byly rovněž použity pro odlišení biofilmpozitivních a biofilmnegativních kmenů *S. epidermidis* [38]. Biofilmpozitivní kmeny jsou obvykle obklopeny extracelulární polymerní matrix, tzv. slizem, který mění jejich povrchové vlastnosti ve srovnání s biofilmnegativními kmeny. Sliz biofilmpozitivních kmenů je tvořen poly β-1,6-N-acetylglukosaminem. Volné aminoskupiny vzniklé deacetylací některých acetylglukosaminových zbytků pak dávají tomuto polymeru kladný náboj [49].

Kapilární zónová elektroforéza patří mezi nejjednodušší elektromigrační techniky. Jednotlivé ionogenní částice se separují v důsledku své rozdílné elektroforetické pohyblivosti, mobility (m), která je přímo úměrná výslednému náboji částice (q) a nepřímo úměrná jeho velikosti – poloměru (r) a viskozitě roztoku (ν):

$$m = q/6\pi \nu r$$

Kromě elektroforetického pohybu nabitých částic je celý objem kapiláry uváděn do pohybu elektroosmotickým tokem (EOF), který je orientován směrem ke katodě. Vzniká působením stejnosměrného elektrického pole na difuzní část elektrické dvojvrstvy, na rozhraní pevné a kapalné fáze u vnitřní stěny kapiláry [24]. Pohyb částice v kapiláře je pak dán výslednicí elektroforetické pohyblivosti (m) a EOF. Pohyb jednotlivých separovaných zón v kapiláře je sledován pomocí absorpce záření ve zvoleném místě kapiláry, nejčastěji pomocí vhodného detektoru. Jako příklad je uveden elektroforeogram CZE separace biofilmpozitivních a biofilmnegativních *S. epidermidis* dynamicky modifikovaných fluorescenční látkou, kyselinou 1,4-pyren máselnou, umožňující citlivou fluorescenční detekci jednotek až desítek mikroorganismů ve vzorku [23] (viz obr. 2).

Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) využívá při separaci amfoterní povahy mikrobiálních částic, které jsou podle distribuce kladných a záporných povrchových nábojů charakterizovány

Epidemiologie 1-06 19.1.2006 10:07 Str. 28
proLékaře.cz | 5.12.2026

izoelektrickým bodem (p*I*). Izoelektrický bod je takové pH, při kterém je disociace kladných a záporných nábojů stejná a výsledný náboj je nulový. Elektromigrace probíhá v gradientu pH. Částice migrují kapilárou, dokud nedoputují do té části separačního prostředí pH gradientu, jehož pH je rovno jejich p*I*. Zde se jejich pohyb zastaví a částice se stejným p*I* se v tomto místě zafokusují. Po dosažení ustáleného stavu se fokusované zóny mobilizují, např. hydrodynamickým tokem vyvolaným přetlakem či podtlakem na jednom konci kapiláry [24]. Separované a fokusované mikroorganismy pak mohou být detekovány obdobným způsobem, jaký byl popsán u CZE. Také touto metodou se podařilo separovat a odlišit biofilmpozitivní kmeny *S. epidermidis* od biofilmnegativních. Navíc bylo zjištěno, že biofilmpozitivní kmeny se účinkem ultrazvuku začaly fokusovat jako kmeny biofilmnegativní. Biofilmnegativní kmeny účinkem ultrazvuku ovlivněny nebyly [38] (viz obr. 3). To potvrzuje předpoklad, že příčinou rozdílu mezi těmito kmeny je přítomnost EPS na jejich povrchu.

Závěr

K charakteristickým rysům biofilmových infekcí patří tvorba obtížně eliminovatelných ložisek, chronicita a časté recidivy infekce. Biofilm poskytuje mikrobiálním buňkám ochranu nejen proti imunitnímu systému, ale také proti celé řadě antibakteriálních látek. Jejich koncentrace, potřebné k eradikaci biofilmu, vysoce překračují koncentrace dosahované běžným dávkováním. To značně komplikuje léčbu těchto infekcí [28, 44]. Podání takových antibakteriálních látek sice potlačuje symptomy infekce likvidací volně plovoucích bakterií uvolněných z přisedlé populace, obvykle ale nedojde k likvidaci bakteriálních buněk dosud usazených v matrix biofilmu. Po ukončení antimikrobiální léčby pak biofilm s přežívajícími bakteriemi slouží jako ložisko a vyvolá recidivu infekce. V těchto případech pak nezbývá, než kolonizovaný povrch chirurgicky odstranit z organismu [47]. Tento významný faktor virulence, usnadňující bakteriím přežívat v hostitelském organismu, indikuje vyšší klinickou významnost izolovaného kmene. Proto by měl být tvorba biofilmu u závažných invazivních infekcí, zvláště těch, které jsou spojené s umělými implantáty, sledována. Vzhledem ke složitosti celého procesu, nárokům vyšetřovaných mikroorganismů i k nedostatkům jednotlivých metod, není volba vhodné metody jednoduchá. Nejspolehlivěji můžeme prokázat tuto vlastnost kombinací popsaných metod. Například při posuzování schopnosti *S. epidermidis* tvořit biofilm je výhodné kombinovat průkaz *ica* operonu s fenotypovým průkazem, např. CTT [37]. Popsané kapilární elektromigrační techniky jsou zatím ve stadiu vývoje.

Poděkování

Práce vznikla s podporou grantů IGA MZ NR / 7980-3 a GA AVČR A4031302.

Literatura

1. **Ammendolia, M. G., Di Rosa, R., Montaro, L., Arciola, C. R., Baldassarri, L.** Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylogoccal clinical isolates. J Clin Microbiol, 1999, 37, 10, 3235–3238.
2. **An, Y. H., Friedman, R. J.** Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. J Microbiol Methods, 1997, 30, 2, 141–152.
3. **Armstrong, D. W., Schneiderheinze, J. M., Kullman, J. P., He, L.** Rapid CE microbial assays for consumer products that contain active bacteria. FEMS Microbiol Lett, 2001, 194, 1, 33–37.
4. **Baldassarri, L., Simpson, W. A., Donelli, G., Christensen, G. D.** Variable fixation of staphylococcal slime by different histochemical fixatives. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1993, 12, 11, 866–868.
5. **Bagge, N., Schuster, M., Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E. P., Hoiby, N.** *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48, 4, s. 1175–1187.
6. **Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L., Beachey, E. H.** Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect Immun, 1982, 37, 1, 318–326.
7. **Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F. et al.** Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol, 1985, 22, 6, 996–1006.
8. **Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. et al.** Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol, 1995, 49, 711–745.
9. **Costerton, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C., Ehrlich, G.** The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. J Clin Invest, 2003, 112, 10, 1466–1477.
10. **Černohorská, L., Votava, M.** Biofilmy a jejich význam v lékařské mikrobiologii. Epidemiol Mikrobiol, Imunol, 2002, 51, 4, 161–164.
11. **Davey, M. E., O'Toole, G. A.** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64,4, 847–867.
12. **Desai, M. J., Armstrong, D. W.** Separation, identification, and characterization of microorganisms by capillary electrophoresis. Microbiol Mol Biol Rev, 2003, 67, 1, 38–51.
13. **Donlan, R. M.** Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. Clin Infect Dis, 2001, 33, 8, 1387–1392.
14. **Frebourg, N. B., Lefebvre, S., Baert, S., Lemeland, J. F.** PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains; J Clin Microbiol, 2000, 38, 2, 877–880.
15. **Freeman, D. J., Falkiner, F. R., Keane, C. T.** New met-

Epidemiologie 1-06 19.1.2006 10:07 Str. 29
proLékaře.cz | 5.12.2026

hod for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J clin Pathol, 1989, 42, 8, 872–874.
16. **Gracia, E., Fernandez, A., Conchello, P., Lacleriga, A. et al.** Adherence of Staphylococcus aureus slime-producing strain variants to biomaterials used in orthopaedic surgery. Int Orthop, 1997, 21, 1, 46–51.
17. **Hawser, S. P., Douglas, L. J.** Biofilm formation by Candida species on the surface of catheter materials in vitro. Infect Immun, 1994, 62, 3, 915–921.
18. **Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N. et al.** Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. Mol Microbiol, 1996, 20, 5, 1083–1091.
19. **Holá, V., Růžička, F., Votava, M.** Impact of surface coating on the adherence of slime producing and nonproducing *Staphylococcus epidermidis.* New Microbiologica, 2004, 27, 3, 305–308.
20. **Holá, V., Růžička, F., Votava, M.** Využití mikroskopických technik k průkazu a při studiu dynamiky růstu biofilmu. Bull Čs Spol mikrobiol, 2004, 45, suppl. A; 172.
21. **Holá, V., Růžička, F., Tejkalová, R., Votava, M.** Stanovení citlivosti k antibiotikům u biofilmpozitivních forem mikroorganizmů. Klin Mikrobiol Infekč Lék, 2004, 10, 5, 218–222.
22. **Horká, M., Planeta, J., Růžička, F., Šlais, K.** Sol-gel column technology for capillary isoelectric focusing of microorganism and biopolymers with UV or fluorometric detection. Eletrophoresis, 2003, 24, 9, 1383–1390.
23. **Horká, M., Růžička, F., Holá, V., Šlais, K.** Dynamic modification of microorganisms by pyrenebutanoate for fluorometricdetection in capillary zone electrophoresis. Electrophoresis, 2005, 26, 3, 548–555.
24. **Kašička, V.** Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. Chem Listy, 1997, 91, 320–329.
25. **Kennedy, C. A., O'gara, J. P.** Contribution of culture media and chemical properties of polystyrene tissue culture plates to biofilm development by *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol, 2004, 53, 1171–1173.
26. **Knobloch, J. K., Horstkotte, M. A., Rohde, H., Mack, D.** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Med Microbiol Immunol, 2002, 191, 2, 101–106.
27. **Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W. et al.** Optical sectioning of microbial biofilms. J Bacteriol, 1991, 173, 20, 6558–6567.
28. **Mah, T. F., O'Toole, G. A.** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol, 2001, 9, 1, 34–39.
29. **McAteer, J. A., Davis, J. M.** *The culture of attached cells.* In *Davis, J. M. et al. Basic Cell Culture: A Practical Approach.* Oxford: Oxford University Press, 2002, 149–157.
30. **Mulder, J. G., Degener, J. E.** Slime-producing properties of coagulase negative stapylococci isolated from blood cultures. Clin Microbiol Infect, 1998, 4, 689–694.
31. **Müller, E., Asmus, B., Hartmann, A., Seiler, K. P.** The in situ detection of microbial biofilm on karst rock coupon in groundwater habitat. In Flemming, H. C. et al. Biofilms – Investigative methods and application. Lancaster: Technomics Publ. Co., 2000, 155–163.
32. **O'Toole, G., Kaplan, H. B., Kolter, R.** Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol, 2000, 54, 49–79.
33. **Ozerdem Akpolat N., Elci, S., Atmaca, S., Akbayin, H.** The effects of magnesium, calcium and EDTA on slime production by *Staphylococcus epidermidis* strains. Folia Microbiol, 2003, 48, 5, 649–653.
34. **Podbielski, A., Kreikemeyer, B.** Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. Int J Infect Dis, 2004, 8, 2, 81–95.
35. **Raad, I.** Intravascular-catheter-related infections. Lancet, 1998, 351, 9106, 893–898.
36. **Rohde, H., Kalitzky, M., Kroger, N., Scherpe, S. et al.** Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. J Clin Microbiol, 2004, 42, 12, 5614–5619.
37. **Růžička, F., Holá, V., Votava, M., Tejkalová, R. et al.** Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. Folia Microbiol, 2004, 49, 5, 596–600.
38. **Růžička, F., Horká, M., Holá, V., Votava, M.** Capillary Isoelectric Focusing – useful tool for detection of the biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. In prep.
39. **Schembri, M. A., Hjerrild, L., Gjermansen, M., Klemm, P.** Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43. J Bacteriol, 2003, 185, 7, 2236–2242.
40. **Schindler, J.** Mikrobiální biofilm. Vesmír, 2001, 80, 4, 203–206.
41. **Shen, Y., Berger, S. J., Smith, R. D.** Capillary isoelectric focusing of yeast cells. Anal Chem, 2000, 72, 19, 4603–4607.
42. **Sherertz, R. J., Raad, I. I., Belani, A., Koo, L. C. et al.** Three-year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol, 1990, 28, 1, 76–82.
43. **Shin, J. H., Kee, S. J., Shin, M. G., Kim, S. H. et al.** Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. J Clin Microbiol, 2002, 40, 4, 1244–1248.
44. **Souli, M., Giamarellou, H.** Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother, 1998, 42, 4, 939–941.
45. **Stepanovic, S., Djukic, N., Djordjevic, V., Djukic, S.** Influence of the incubation atmosphere on the production of biofilm by staphylococci. Clin Microbiol Infect, 2003, 9, 955–958.
46. **Stepanovic, S., Vukovic, D., Jezek, P., Pavlovic, M., Svabic-Vlahovic, M.** Influence of dynamic conditions on biofilm formation by staphylococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2001, 20, 7, 502–504.
47. **Stewart, P. S., Costerton, J. W.** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet, 2001, 14, 358, 9276, s. 135–138.
48. **Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M. J. et al.** The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. Appl Environ Microbiol, 2001, 67, 10, 4538–4545.
49. **Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J. M., Yao, Y. et al.** A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. J Biol Chem, 2004, 279, 52, 54881–54886.
50. **Zobell, C. E., Allen, E. C.** The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. J Bacteriol, 1935, 29, 239–251.

Do redakce došlo 27. 5. 2005

MUDr. Filip Růžička
Mikrobiologický ústav Masarykovy univerzity
Pekařská 53
656 91 Brno
e-mail: fruzic@fnusa.cz