Epidemiologie 2-010 22.4.2010 7:48 Str. 80
proLékaře.cz | 29.12.2026

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 59, 2010, č. 2, s. 80–87

Citlivosť kmeňov *Staphylococcus aureus* rastúcich v biofilme na vankomycín, gentamicín a rifampicín

Kotulová D., Slobodníková L.

Mikrobiologický ústav LFUK a FNsP, Bratislava, Slovenská republika

Súhrn

Cieľ práce. **Detekovať tvorbu biofilmu u kmeňov *Staphylococcus aureus* a určiť koncentrácie vankomycínu, gentamicínu a rifampicínu, ktoré zabránia množeniu *S. aureus* v biofilme (minimálne biofilm inhibujúce koncentrácie - MBIC), alebo vedú k jeho eradikácii (minimálne biofilm-eradikujúce koncentrácie – MBEC). Porovnať tieto údaje s hodnotami minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) a minimálnej baktericídnej koncentrácie (MBC) u identických kmeňov baktérií, rastúcich v planktonickej forme, v ktorej sa bežne testuje v laboratóriu citlivosť na antiinfekčné liečivá pre potreby individualizovanej terapie.**

Pacienti a metódy: **Do testovaného súboru baktérií sa zaradilo 15 kmeňov *S. aureus*, izolovaných z centrálnych venóznych katétrov, intratracheálnych kanýl a ranových drénov od pacientov FNsP Bratislava-Staré Mesto. Charakterizovali sa ich vybrané faktory virulencie. Schopnosť tvoriť biofilm sa určila modifikovanou mikrometódou s kryštalickou violeťou (KV). Prítomnosť živých buniek v biofilme sa určovala s použitím 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazólium bromidu (MTT). MIC a MBC vankomycínu, gentamicínu a rifampicínu sa testovala v planktonickej forme rastu kmeňov *S. aureus* bujónovou mikrodiluènou metódou. Účinok týchto antibiotík na inhibíciu a eradikáciu živých baktérií v biofilme sa testoval modifikovanou mikrodiluènou metódou. Výsledky sa štatisticky hodnotili Studentovým t-testom.**

Výsledky: **Podľa našich výsledkov všetky kmene tvorili biofilm a iba dva z nich ho tvorili slabo. Pri hodnotení metabolickej aktivity baktérií v biofilme (MTT) sa zistila u nich stredná alebo vysoká aktivita. Pri sledovaní účinku vankomycínu in vitro sa zistilo, že hodnoty MIC a MBIC u vankomycínu sú u 80 % kmeňov identické. Hodnoty MBEC vankomycínu sú však vyššie ako MBC u všetkých vyšetrovaných kmeňov, ich hodnota patrí podľa kritérií Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) do kategórie rezistencie a toto antibiotikum už nie je použiteľné v terapii. Pri hodnotení výsledkov gentamicínu sa ukázalo, že in vitro inhibuje biofilm v koncentráciách, ktoré sa zaraďujú podľa CLSI do kategórie citlivý, avšak hodnoty, potrebné na eradikáciu, sú interpretované ako rezistencia kmeňa. Pri testovaní rifampicínu sa hodnoty MIC aj MBIC pohybovali v kategórii citlivý. Hodnoty MBC sa interpretovali v kategórii citlivý, ale MBEC už v 13 % ako rezistentný a 13 % ako intermediárne citlivý. Rozdiely v nameraných hodnotách MIC a MBIC gentamicínu a rifampicínu a MBC a MBEC všetkých testovaných antibiotík boli štatisticky signifikantné.**

Záver: **Nami sledované kmene *S. aureus* sú v biofilme eradikované iba vyššími koncentráciami vankomycínu, gentamicínu a rifampicínu, pričom hodnoty MBEC použiteľné v terapii dosahoval iba rifampicín.**

Z hľadiska poskytovania spoľahlivých výsledkov pre voľbu terapie antiinfekčnými liečivami bude perspektívne potrebné zisťovať in vitro tvorbu biofilmu, testovať MBIC a MBEC liečiv štandardizovanou metódou, interpretovať výsledky vo vzťahu k baktériám rastúcim v biofilme a stanoviť hraničné koncentrácie MBIC a MBEC obdobne ako je to pri kritériách pre hodnotenie MIC a MBC.

Kľúčové slová: S. aureus **– biofilm – citlivosť na antimikrobiálne liečivá – vankomycín – gentamicín – rifampicín.**

Summary

Kotulová D., Slobodníková L.: Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Biofilms to Vancomycin, Gentamicin and Rifampin

Study objectives: **To detect biofilm formation in *Staphylococcus aureus* strains and to determine the minimal biofilm inhibition concentrations (MBIC) and the minimal biofilm eradicating concentrations (MBEC) of vancomycin, gentamicin and rifampin. To compare the MBIC and MBEC with the minimal inhibition concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) data for planktonic *Staphylococcus aureus* forms that are commonly used in antimicrobial susceptibility testing for the purposes of individualized therapy.**

Patients and Methods: **Fifteen S. aureus strains isolated from central venous catheters, intratracheal tubes and wound drainage tubes from the patients of the University Hospital,**

Epidemiologie 2-010 22.4.2010 7:48 Str. 81
proLékaře.cz | 29.12.2026

Bratislava-Staré Mesto were included in the study. Selected virulence factors were characterized. The biofilm formation potential was measured by a modified crystal violet micro-assay. The presence of viable cells biofilm in was tested using 3-(4,5-dimethylthiazol--2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). The MIC and MBC of vancomycin, gentamicin and rifampin was tested in planktonic S. aureus forms by the broth microdilution method. The MBIC and MBEC of these antimicrobial drugs for biofilm S. aureus forms were determined by a modified microdilution method. Student's t-test was used for statistical analysis of the results.

Results: **All of the study strains formed biofilm, with only two of them having a low biofilm formation potential. MTT revealed moderate to high metabolic activity of bacteria biofilm in Vancomycin MICs and MBICs were identical in 80 % of the study strains. Vancomycin MBECs are higher than MBCs in all the study strains, are interpreted as resistance according to the criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and make the drug unsuitable for use in the treatment. In vitro gentamicin MBICs indicated susceptibility according to the CLSI criteria but gentamicin MBECs were interpreted as gentamicin resistance. Rifampin MICs and MBICs of the study strains revealed susceptibility. Rifampin MBCs were interpreted as susceptibility, but based on MBECs, 13 % of the study strains were considered as resistant and 13 % of the study strains showed intermediate susceptibility. The differences between gentamicin and rifampin MICs and MBICs and those between MBCs and MBECs of all antimicrobials tested were statistically significant.**

Conclusion: **The tested biofilm S. aureus forms showed high MBECs of vancomycin, gentamicin and rifampin, with rifampin only being suitable for therapeutic use.**

To provide reliable results for individualized antibiotic therapy, it will be needed to test in vitro biofilm formation, to determine MBIC and MBEC of antimicrobial drugs using a standardized method, to interpret the test results in relation to biofilm *S. aureus* forms and to establish the interpretation criteria for MBIC and MBEC similarly to MIC and MBC.

Key words: S. aureus **– biofilm – susceptibility to antimicrobial drugs – vancomycin – gentamicin – rifampin.**

Baktérie môžu rásť vo forme biofilmu na živých i neživých povrchoch v prírode, v rôznych prístrojoch a vedeniach v priemysle i domácnostiach, ako aj v zdravotníckych zariadeniach [13]. Môžu byť pôvodcami chorôb u pacientov a spôsobiť aj nozokomiálne infekcie. V ľudskom organizme tvorí fyziologickú flóru kože a slizníc tiež biofilm, ktorý je polymikrobiálny a má ochranný význam v danej lokalite. Biofilmy, tvorené prevažne iba jedným druhom baktérií, prípadne kvasiniek, vznikajú na vlastnom, poškodenom, primárne sterilnom tkanive, napr. na srdcovej chlopni, alebo na tkanive prostaty. Patogeneticky častejšie sa však uplatňujú na povrchu cudzích telies – rôznych implantátov, drénov, katétrov a spôsobujú infekcie z prítomnosti cudzieho telesa [14, 17]. Mikroorganizmy na nich rastú v trojdimenziálnom matrixe, pričom produkcia hlienu nemusí byť v korelácii s ich množením. Z povrchu biofilmu sa môžu mikroorganizmy uvoľňovať a môžu metastázovať do iných lokalít. Mikroorganizmy v biofilme sú rezistentnejšie voči účinku antiinfekčných liečiv a ochorenia s nimi súvisiace predstavujú závažný medicínsky problém z pohľadu terapie i prevencie [9, 29]. Môže ísť o rezistentné baktérie, ktoré ak navyše rastú v biofilme, jeho štruktúry môžu ďalej znižovať účinok antiinfekčných liečiv. Okrem toho sa baktérie perzistujúce v biofilme na povrchu plastových aj kovových materiálov môžu dostať do metabolického útlmu, v ktorom nie sú citlivé na liečivá pôsobiace na rastúce baktérie [9, 28].

S. aureus patrí medzi častých pôvodcov infekcií z prítomnosti cudzieho telesa. Na intravenózne a centrálne venózne katétre môže prerásť z fyziologickej flóry pacienta, alebo sa do týchto lokalít dostane z rúk ošetrujúceho personálu. Na implantáty sa tieto baktérie môžu dostať peroperačne, ale aj ako následok infekcií krvného prúdu. Môžu spôsobiť periimplantitídy a metastázovať do organizmu [9].

Tvorba stafylokokového biofilmu začína adhéziou na pevný povrch a následne dochádza k ich rastu a rozmnožovaniu vo viacerých vrstvách. Proces závisí od vlastností baktérie, ako aj od povrchu plastového materiálu. Úvodný krok pri tvorbe biofilmu baktériami druhu *S. aureus* sa uskutočňuje prostredníctvom elektrostatických interakcií medzi teichoovou kyselinou a povrchom biomateriálov, alebo pomocou mikrobiálnych povrchových komponentov rozpoznávajúcich adhezívne matrixové molekuly (microbial surface components recognising adhesive matrix molecules; MSCRAMM). V druhom prípade adheruje *S. aureus* na povrch biomateriálov, ktoré sú povlečené biomolekulami hostiteľa, akými sú napríklad fibronektín, ktorý rozoznáva stafylokokový proteín viažuci fibronektín, alebo fibrín, ktorý rozoznáva stafylokokový zhlukovací faktor. Druh *S. aureus* má schopnosť adherovať aj na ďalšie biomolekuly, prítomné v organizme pacienta, medzi ktoré patrí kolagén, laminín a vitronektín [8, 23].

Epidemiologie 2-010 22.4.2010 7:48 Str. 82
proLékaře.cz | 29.12.2026

Po adhézii baktérií nasleduje tvorba extracelulárneho biofilmového matrixu, pri ktorej sa uplatňujú intercelulárne adhezíny. Úlohu polysacharidového intercelulárneho adhezínu (PIA) hrá pri druhu *S. aureus* poly-N-acetylglukózamín (PNAG), syntetizovaný pomocou enzýmov, kódovaných *ica* operónom (*ica* = „intercellular adhesine" operón) [8, 10, 24]. Viaceré štúdie naznačujú, že všetky kmene *S. aureus* vlastnia tento operón. Okrem toho sa dokázalo, že okrem PNAG môže *S. aureus* vlastniť aj ďalšie mechanizmy produkcie biofilmu, ktoré sú nezávislé od *ica* operónu [23, 29]. Adhéziu a dynamiku tvorby biofilmu ovplyvňuje aj výmena informácií medzi baktériami, tzv. „quorum sensing" proces, ktorý zasahuje do regulácie akcesórneho génového regulátora *agr* systému [4]. Prostredníctvom neho sa u *S. aureus* moduluje expresia faktorov virulencie v odpovedi na autoindukujúce peptidy (AIPs), ktorých koncentrácia v prostredí rastie so zvyšujúcou sa denzitou bakteriálnej populácie. Represia *agr* systému pri nízkych denzitách populácie má za následok zvýšenú adhezívnosť a tvorbu biofilmu a jeho aktivácia pri kritickom zvýšení populačnej denzity baktérií vedie k zvýšeniu tvorby extracelulárnych invazínov a degradácii biofilmu, čo má za následok uvoľnenie baktérií z biofilmu a možný vznik infekčných metastáz v organizme [10]. Ak sa v infekčnom ložisku pacienta vytvorí zrelý biofilm, predstavuje štruktúru, do ktorej ťažšie prenikajú antibiotiká a je účinnou bariérou aj proti mechanizmom imunity, a tak antiinfekčná terapia chronickej infekcie implantátu môže zlyhávať [9]. Okrem uvedených faktorov na expresiu génov pre tvorbu biofilmu v závislosti od typu povrchu pôsobia aj ďalšie faktory – stimulačne napríklad heparín [25, 26] a subinhibičné koncentrácie tetracyklínu, chinupristínu/dalfopristínu a erytromycínu a inhibične vysoké koncentrácie betalaktámových liečiv, chinolónov, tetracyklínu a aminoglykozidov [20].

Vankomycín, gentamicín a rifampicín patria medzi antibiotiká najčastejšie používané pri terapii infekcií spojených s cudzími telesami. Cieľom našej práce bolo zistiť tvorbu biofilmu u testovaných baktérií a následne určiť koncentrácie týchto antibiotík, ktoré by in vitro zabránili množeniu testovaných kmeňov *S. aureus* v biofilme, alebo by mali za následok ich úplnú eradikáciu vo vytvorenom biofilme. Hodnoty týchto koncentrácií sa porovnali s hodnotami MIC a MBC u identických kmeňov baktérii, rastúcich v planktonickej forme, v ktorej sa bežne testuje v laboratóriu pre potreby individualizovanej terapie ich minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) a pri závažnejších infekciách minimálna baktericídna koncentrácia (MBC) antimikróbnych liečiv.

Pacienti a metódy

Do testovaného súboru baktérií sa zaradilo 15 kmeňov *S. aureus*, izolovaných z centrálnych venózných katétrov, intratracheálnych kanýl a ranových drénov od pacientov FNsP Bratislava-Staré Mesto. Kultivácia vzoriek, izolácia a identifikácia kmeňov baktérií sa uskutočnila štandardnými diagnostickými postupmi [18].

Tvorba betalaktamázy sa určila nitrocefinovým diskom [18]. Citlivosť voči betalaktámovým liečivám sa testovala cefoxitínovým diskom [5] a konfirmovala detekciou PBP2a latexovým aglutinačným testom (Oxoid).

Schopnosť tvoriť biofilm sa stanovila mikrometódou kultiváciou stafylokokov v mozgovo-srdcovom bujóne (BHI; Oxoid) 24 hodín pri 35 °C v 96 jamkovej mikrotitračnej platničke s plochým dnom (Sarsted). Do každej jamky sa napipetovalo 230 µl BHI a 20 µl bakteriálnej suspenzie, vykultivovanej na Columbia agare (Oxoid, UK) s 5% konskou krvou, nariedenej v destilovanej vode na 0,5 Mc Farlandovej stupnice (10^8 baktérií v ml). Konečná koncentrácia baktérií v jamke bola približne 2.10^6 v 250 µl BHI. V kontrolnej jamke bolo čisté BHI médium. Každý kmeň bol testovaný v troch jamkách. Vytvorený biofilm sa oplachoval 3-krát 300 µl fosfátového tlmivého roztoku pH 7,4 (PBS). Intenzita tvorby biofilmu sa určovala modifikovanou metódou s kryštálovou violeťou (Merck) podľa Christensena opísanou v práci Holá et al. [15] a Stepanović et al. [28]. Platne sa v invertovanej polohe zbavili zvyškov premývacieho PBS a fixovali 15 minút pridaním 160 µl metanolu do každej jamky. Po vyprázdnení sa platničky nechali sušiť v invertovanej polohe do ďalšieho dňa. Potom sa do každej jamky pridalo 160 µl kryštálovej violeti. Po 5 minutách sa zvyšok farby odstránil pipetou a po premytí pod tečúcou vodou sa platne nechali usušiť. Farbivo viazané na biofilm sa resolubilizovalo v 96% etanole, ktorý sa pridal v množstve 160 µl do každej jamky. Zakryté platne sa nechali stáť pri izbovej teplote 4 hodiny. Výsledná intenzita farebnej reakcie sa merala spektrofotometricky pomocou prístroja MRX Microplate Reader (Dynex) pri vlnovej dĺžke 570 nm.

Prítomnosť živých buniek v biofilme sa určovala kolorimetricky v mikrotitračných platničkách s použitím 3-(4,5dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazólium bromidu (MTT) modifikovanou metódou podľa Gattringera et al. [12]. Pri kultivácii kmeňov *S. aureus* v mikroplatničke sa postupovalo obdobne ako pri metóde detekcie biofilmu kryštálovou violeťou. Po 24-hodinovej kultivácii a po premytí vzniknutého biofilmu sa k baktériám pridalo 227 µl BHI a 23 µl 0,1 % MTT (w/V). Mikroplatničky sa inkubovali 2 hodiny pri 35 C. Po redukcii MTT živými baktériami sa výsledná optická denzita (OD) merala prístrojom MRX Microplate Reader (Dynex) pri vlnovej dĺžke 490 nm.

Výsledky sa vyhodnotili porovnaním s negatívnou kontrolou (médium bez baktérií). Hraničná hodnota optickej denzity (ODc) sa vypočítala súčtom priemernej hodnoty OD kontrolných vzoriek a trojnásobku smerodajnej odchýlky [26]. Výsledky sa udávajú nasledovne:

- OD < ODc baktérie netvoria biofilm (-)
- ODc ≤ OD < 2x ODc baktérie tvoria slabo biofilm (+)
- 2x ODc ≤ OD < 4x ODc baktérie tvoria stredne intenzívne biofilm (++)
- 4xODc ≤ OD baktérie tvoria vysoko intenzívne biofilm (+++)

Minimálna inhibičná koncetrácia (MIC) a minimálna baktericídna koncentrácia (MBC) vankomycínu, gentamicínu a rifampicínu (Sigma-Aldrich) sa testovala v planktonickej forme rastu kmeňov *S. aureus* bujónovou mikrodilučnou metódou podľa CLSI [6].

Minimálna biofilm-inhibujúca koncentrácia sa testovala

Epidemiologie 2-010 22.4.2010 7:48 Str. 83
proLékaře.cz | 29.12.2026

modifikovanou metódou podľa autorov Holá et al. [15]. Baktérie sa kultivovali v mikroplatničkách v MH bujóne 24 hodín pri teplote 35 °C. Po kultivácii sa platničky 3-krát premyli PBS, obdobne ako v prvej časti práce, čím sa odstránili baktérie neintegrované do biofilmu. K biofilmu v jamkách sa pridávali antiinfekčné liečivá nariedené v MH bujóne (vankomycín v koncentráciách 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256; 512 mg/l, gentamicín v koncentráciách 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256; 512 mg/l, rifampicín v koncentráciách 0,008; 0,016; 0,032; 0,064; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 ;16; 32 mg/l). Uvedené koncentrácie sa zvolili podľa CLSI [6, 7] a zistených hodnôt MIC a MBC testovaných antibiotík.

Po ďalšej 24-hodinovej inkubácii pri 35 °C sa vizuálne odčítali hodnoty minimálnej biofilm inhibujúcej koncentrácie (MBIC) v mg/l (hodnotilo sa vytvorenie zákalu, resp. jeho neprítomnosť v jednotlivých testových jamkách). Potom sa médium s antibiotikami odsalo, jamky sa jeden krát premyli 300 µl PBS a pridalo sa 250 µl BHI bujónu bez antibiotík. Po inkubácii 24 hodín pri 35 °C sa vizuálne odčítal vzniknutý zákal a určila sa hodnota MBEC.

Výsledky sa štatisticky analyzovali Studentovým t-testom.

Výsledky

Z 15 vyšetrovaných kmeňov *S. aureus* boli 4 rezistentné na betalaktámové liečivá v cefoxitínovom teste, aj v konfirmačnom teste detekcie PBP2a (MRSA, tab. 1). Z 11 citlivých kmeňov 3 netvorili betalaktamázu (tab. 1).

Pri hodnotení výsledkov tvorby biofilmu kryštálovou violeťou, ktorá zafarbí všetky baktérie, sa u 2 kmeňov zistila jeho slabá tvorba (+), u ostatných kmeňov sa detegovala stredne (++) až vysoko (+++) intenzívna tvorba biofilmu (tab. 2).

Pri hodnotení tvorby biofilmu meraním metabolickej aktivity živých baktérií v biofilme (MTT) sa namerala stredná (++) až vysoká (+++) intenzita, a to nezávisle od citlivosti na betalaktámové liečivá. Pri sledovaní účinku vankomycínu na biofilm vytvorený testovanými kmeňmi *S. aureus* (tab. 2) sa ukázalo, že iba v prípade 3 z 15 kmeňov boli hodnoty MBIC vyššie (2 mg/l) ako MIC (1 mg/l). Tieto hodnoty zaraďujú analyzované kmene podľa interpretácie CLSI [7] medzi citlivé na vankomycín. Hodnoty MBC sa pohybovali medzi 2–8 mg/l s interpretáciou citlivý alebo intermediárne citlivý kmeň. Na eradikáciu biofilmu *in vitro* (MBEC) však bolo potrebné použiť 16 až 512 mg/l vankomycínu. Takéto koncentrácie sú už terapeuticky nepoužiteľné a CLSI [7] ich zaraďuje do kategórie rezistencie. Pri analýze výsledkov účinku gentamicínu (tab. 2) sa zistilo, že hodnoty MBIC boli vyššie ako MIC u 93 % testovaných kmeňov. Tieto hodnoty boli v rozmedzí 1–4 mg/l, čo v interpretácii znamená kmene citlivé na gentamicín. Namerali sa však oveľa vyššie hodnoty MBEC (32–128 mg/l) – tu už ide o koncentrácie nepoužiteľné v terapii, s interpretáciou „rezistentný kmeň“. MIC rifampicínu v súbore testovaných kmeňov sa pohybovali v intervale 0,008–0,125 mg/l, MBC a MBIC v rozmedzí 0,016–0,125 mg/l so zaradením kmeňov podľa CLSI do kategórie „citlivý“. Na eradikáciu baktérií v biofilme in vitro (MBEC) bola potrebná u 2 kmeňov koncentrácia 1,0 mg/l (citlivý kmeň), u 11 kmeňov 2,0 mg/l (intermediárne citlivý kmeň) a u 2 kmeňov 4 mg/l, pričom podľa CLSI [7] táto koncentrácia zaraďuje kmene do kategórie „rezistentný“. Štatistická analýza výsledkov ukázala, že rozdiely nameraných hodnôt MIC a MBIC boli vysoko signifikantné v prípade gentamicínu ($p < 0,0001$) a rifampicínu ($p = 0,0022$) a rozdiely medzi nameranými hodnotami MBC a MBEC boli vysoko signifikantné u všetkých troch testovaných antibiotík ($p < 0,0001$).

Tab. 1. Charakteristika kmeňov *S. aureus* zahrnutých do štúdie
C – citlivý, R – rezistentný, CXT – výsledok cefoxitínového skríningového testu, PBP2a – proteín viažuci penicilín 2a, MTT – 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazólium bromid

Table 1. Characteristics of the *S. aureus* strains included in the study
C – susceptible, R – resistant, CXT – cefoxitin screening test result, PBP2a – penicillin binding protein 2a, MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

Kmeň	β-laktamáza	CXT	PBP2a	Biofilm	
				kryštálová violeť	MTT
1	+	R	+	++	++
2	+	R	+	+++	++
3	+	R	+	+++	+++
4	+	R	+	+++	++
5	-	C	-	+	++
6	+	C	-	+++	++
7	+	C	-	++	++
8	+	C	-	++	+++
9	+	C	-	++	+++
10	-	C	-	+	+++
11	-	C	-	+++	+++
12	+	C	-	+++	+++
13	+	C	-	+++	+++
14	+	C	-	+++	++
15	+	C	-	+++	+++

Epidemiologie 2-010 22.4.2010 7:48 Str. 84
proLékaře.cz | 29.12.2026

Tab. 2. Vplyv vankomycínu, gentamicínu a rifampicínu na inhibíciu rastu baktérií v biofilme a na eradikáciu biofilmu hodnoty MIC, MBC, MBIC a MBEC sa udávajú v mg/l
* intermediárne citlivý, ** rezistentný, bez označenia: citlivý; vankomycín C ≤ 2 mg/l, I = 4–8 mg/l, R ≥ 16 mg/l; gentamicín C ≤ 4 mg/l, I = 8 mg/l, R ≥ 16 mg/l; rifampicín C ≤ 1 mg/l, I = 2 mg/l, R ≥ 4 mg/l

Table 2. The inhibition and eradication potential of vancomycin, gentamicin and rifampin against biofilm *S. aureus forms*
MIC, MBC, MBIC and MBEC are in mg/l
* intermediately susceptible, ** resistant, no superscript: susceptible; vancomycin C ≤ 2 mg/l, I = 4–8 mg/l, R ≥ 16 mg/l; gentamicin C ≤ 4 mg/l, I = 8 mg/l, R ≥ 16 mg/l; rifampin C ≤ 1 mg/l, I = 2 mg/l, R ≥ 4 mg/l

Číslo kmeňa	Vankomycín				Gentamicín				Rifampicín			
	MIC	MBC	MBIC	MBEC	MIC	MBC	MBIC	MBEC	MIC	MBC	MBIC	MBEC
1	2	4*	2	16**	1	1	2	64**	0,125	0,25	0,25	4**
2	2	4*	2	128**	1	2	1	64**	0,008	0,125	0,016	1
3	2	8*	2	512**	0,5	2	4	64**	0,016	0,32	0,125	2*
4	2	4*	2	256**	0,5	1	2	64**	0,063	0,125	0,125	2*
5	2	4*	2	512**	2	2	4	32**	0,008	0,125	0,016	2*
6	1	2	2	128**	0,25	1	2	32**	0,008	0,063	0,016	4**
7	1	2	2	128**	2	2	4	64**	0,008	0,125	0,016	2*
8	2	4*	2	128**	2	2	4	32**	0,008	0,125	0,016	2*
9	1	2	2	256**	0,25	0,25	2	32**	0,008	0,125	0,016	2*
10	2	8*	2	512**	1	1	2	32**	0,064	0,125	0,125	2*
11	2	4*	2	256**	1	2	1	32**	0,008	0,125	0,016	2*
12	2	4*	2	128**	1	2	4	32**	0,032	0,125	0,032	1
13	2	4*	2	256**	1	2	2	64**	0,063	0,125	0,125	2*
14	2	8*	2	128**	0,5	1	2	128**	0,008	0,016	0,125	2*
15	2	8*	2	128**	1	2	2	64**	0,063	0,125	0,125	2*

Diskusia

V našej práci sme zistili tvorbu biofilmu u všetkých vyšetrovaných kmeňov *S. aureus*. Pri použití metódy s kryštálovou violeťou sme slabú tvorbu biofilmu dokázali iba u 2 meticilín citlivých kmeňov. Ostatné kmene tvorili biofilm stredne alebo vysoko intenzívne. Pri určovaní metabolickej aktivity živých baktérií vo vzniknutom biofilme metódou s použitím MTT sa ukázalo, že baktérie redukovali MTT buď vysoko intenzívne (8 kmeňov), alebo stredne intenzívne (7 kmeňov). Odlišnosti v intenzite farebnej reakcie pri hodnotení biofilmu dvomi metódami mohli byť spôsobené skutočnosťou, že s použitím MTT sa detekuje metabolizmus živých bakteriálnych buniek a testom s kryštalickou violeťou prítomnosť baktérií v biofilme bez rozdielu ich viability.

V súčasnosti je opísaných viacero metód na testovanie účinku antibiotík na baktérie rastúce v biofilme, ktoré detegujú prítomnosť živých baktérií v biofilme rôznymi spôsobmi (napr. kultiváciou po dezintegrácii biofilmu pôsobením ultrazvuku [16], po mechanickom uvoľnení baktérií z biofilmu vortexom [21], po zotretí biofilmu z testovacej jamky vatovým tampónom [19], hodnotením životaschopnosti baktérií po odstránení antibiotika z kultivačného média zliatím, premytím a doplnením čistého média a ďalšou kultiváciou [15], alebo pomocou MTT a iných farbív, redukovaných metabolizujúcimi baktériami [12, 22].

V našej štúdii sme sa opierali o metódy opísané v prácach autorov Holá et al. [15] a Stepanović et al. [28]. Inhibičný účinok testovaných antibiotík na baktérie v biofilme sme detegovali vizuálne zisťovaním neprítomnosti zákalu v testovacých jamkách mikrotitračnej doštičky a životaschopnosť baktérií v biofilme následným odstránením média s antibiotikom, premytím biofilmu, pridaním média, ďalšou kultiváciou a vizuálnym zistením zákalu.

Zo sledovaných antibiotík sa najmenej vhodným na eradikáciu biofilmu ukázal byť vankomycín, pretože kým interpretácia jeho hodnôt MBC zaraďovala kmene k citlivým, alebo intermediár-

Epidemiologie 2-010 22.4.2010 7:48 Str. 85
proLékaře.cz | 29.12.2026

ne citlivým, zistené hodnoty minimálnych biofilm-eradikujúcich koncentrácií spadali už do kategórie rezistencie (16–512 mg/l).

Hodnoty MIC vankomycínu v planktonickej forme a jeho hodnoty MBIC v biofilme boli obdobné, teda v profylaktickom podávaní by bolo možné vankomycín používať aj u biofilm-pozitívnych kmeňov.

Gentamicín podľa našich výsledkov *in vitro* účinkuje inhibične na rast baktérií v biofilme, pretože zistené hodnoty MBIC podľa kritérií hodnotenia CLSI pre citlivosti baktérií v planktonickej forme rastu patria medzi hodnoty pre citlivé kmene. Hodnoty MBEC, ktoré eradikujú baktérie rastúce v biofilme však už poukazujú na rezistenciu testovaných kmeňov (32–128 mg/l). MBIC a MBEC rifampicínu boli vyššie ako im zodpovedajúce MIC a MBC. Hodnoty MIC aj MBIC sa pohybovali v kategórii citlivý. Hodnoty MBC sa tiež interpretovali v kategórii citlivý, ale MBEC už v 13 % ako rezistentný a v 74 % ako intermediárne citlivý. Napriek tomu by rifampicín mohol byť úspešný pri eradikácii biofilmu v organizme pacienta, ako to naznačujú aj viaceré experimentálne a klinické štúdie [1, 32]. Rifampicín má veľmi dobrý účinok na baktérie v biofilme, ako aj na pomaly rastúce stafylokoky, ktoré sú asociované s infekciou z prítomnosti cudzieho telesa. Výsledný terapeutický efekt sa zlepší a oddiali sa vznik rezistencie, ak sa terapia rifampicínom kombinuje aj s iným antibiotikom [1, 31].

Napriek mnohým publikovaným prácam o biofilmoch doteraz nie je štandardizovaná metóda podľa CLSI na stanovenie citlivosti baktérií v biofilmovej fáze rastu. V literatúre sa však objavujú návrhy štandardnej metódy od autorov, ktorí sa už dlhodobo zaoberajú problematikou interpretácie zistených výsledkov citlivosti baktérií v biofilme pre ošetrujúceho lekára a pre použitie na individualizovanú terapiu [31, 33].

Získavanie relevantných výsledkov testov citlivosti baktérií, ktoré vyvolávajú infekcie spojené s prítomnosťou biofilmu, je mimoriadne dôležité pre rozhodovanie sa pre terapiu pacienta. Predpokladá to vykultivovanie pôvodcu infekcie v mikrobiologickom laboratóriu. Pri odoberaní materiálu sa však môže stať, že vzorka neobsahuje dostatočné množstvo životaschopných baktérií, čo môže byť spôsobené nerovnomerným rozmiestnením baktérií v biofilme [30].

Ďalším problémom pri liečbe týchto pacientov môže byť intracelulárna lokalizácia *S. aureus* v tkanive okolo cudzieho telesa obaleného biofilmom. Tieto baktérie môžu byť prameňom pre jeho novotvorbu aj v prípade, ak by sa biofilm podarilo v organizme pacienta zlikvidovať efektívnym liečivom, ktoré ale intracelulárne nepreniká [27]. Aj z tohto hľadiska sa však rifampicín vďaka svojmu dobrému intracelulárnemu prieniku môže považovať za jedno z najlepších antibiotík na liečbu infekcií spojených s biofilmom [1].

Hrozbou pre pacienta môže byť aj rýchle šírenie sa rezistencie génovým transferom, k čomu ľahšie dochádza medzi baktériami v prostredí biofilmu [11].

Vzhľadom na dynamický proces v živom biofilme sa perspektívne budú objavovať aj iné cesty prevencie vzniku a eradikácie biofilmu ako antibiotická liečba, z ktorých niektoré sa intenzívne študujú viacerými výskumnými skupinami [1, 2, 3].

Záver

V práci sa sledovala tvorba biofilmu a vplyv vankomycínu, gentamicínu a rifampicínu na 15 biofilm tvoriacich kmeňov *S. aureus*, izolovaných z intravenóznych katétrov, centrálnych venóznych katétrov a ranových drénov od pacientov Fakultnej nemocnice Bratislava-Staré mesto. Podľa našich výsledkov *in vitro* s týmto súborom kmeňov sa ukázalo, že všetky kmene tvorili biofilm, ale s rôznou intenzitou. Pri testovaní účinku vybraných antibiotík na biofilm tvoriace baktérie sa zistilo, že hodnoty MIC a MBIC u vankomycínu sú u 80 % kmeňov identické. Hodnoty MBEC vankomycínu sú však u všetkých vyšetrovaných kmeňov vyššie ako MBC; podľa kritérií CLSI patria tieto hodnoty do kategórie rezistencie a antibiotikum nie je použiteľné v terapii. Pri hodnotení výsledkov citlivosti na gentamicín sa ukázalo, že *in vitro* inhibuje a eradikuje biofilm v koncentráciách, ktoré sa zaraďujú podľa CLSI do kategórie citlivý. Avšak koncentrácie, potrebné na eradikáciu, sú interpretované už ako rezistencia kmeňa. Pri testovaní rifampicínu sa hodnoty MIC aj MBIC pohybovali v kategórii citlivý. Hodnoty MBC sa interpretovali v kategórii citlivý, ale MBEC už v 13 % ako rezistentný a 74 % ako intermediárne citlivý. Napriek tomu klinické štúdie poukazujú na to, že v liečbe môže byť použitie rifampicínu úspešné.

Na záver môžeme konštatovať, že aj podľa našich výsledkov sú mikroorganizmy v biofilme rezistentnejšie voči účinku antibakteriálnych liečiv ako v planktonickej forme a preto aj ochorenia spojené s prítomnosťou cudzieho telesa vyžadujú osobitné liečebné postupy.

Z hľadiska poskytovania spoľahlivých výsledkov pre voľbu terapie antiinfekčnými liečivami bude perspektívne potrebné zisťovať *in vitro* tvorbu biofilmu, testovať minimálne biofilm inhibujúce a eradikujúce koncentrácie liečiv štandardizovanou metódou, interpretovať výsledky vo vzťahu k baktériám rastúcim v biofilme a stanoviť hra-

Epidemiologie 2-010 22.4.2010 7:48 Str. 86
proLékaře.cz | 29.12.2026

ničné koncentrácie MBIC a MBEC obdobne ako je to pri kritériách pre hodnotenie MIC a MBC.

Literatúra

1. **Aboltins, C. A., Page, M. A., Buising, K. L., Jenney, A. W. J.,** et al. Treatment of staphylococcal prosthetic joint infections with debridement, prosthesis retention and oral rifampicin and fusidic acid. Clin Microbiol Infect, 2007, 13, 6, 586-591.
2. **Balaban, N., Cirioni, O., Giacometti, A., Ghiselli, R.,** et al. Treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infection by the quorum-sensing inhibitor RIP. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51, 6, 2226-2229.
3. **Belley, A., Neesham-Grenon, E., McKayG., Arhin, F. F.,** et al. Oritavancin kills stationary-phase and biofilm *Staphylococcus aureus* cells in vitro. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53, 3, 918-925.
4. **Boles, B. R., Horswill, A. R.** *agr*-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. PLoS Pathog, 2008, 4, 4, e1000052.
5. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for an Antimicrobial Disc Suspectibility Tests; Approved-Standard-Ninth Edition; Clinical and Laboratory Standards document M2-A9, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898; USA, 2006a: 37.
6. Clinical and Laboratory Standard Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Suspectibility Test for Bacteria that Grow Aerobicaly; Approved-Standard-Seventh Edition; Clinical and Laboratory Standards document M7-A7, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898; USA, 2006b: 49.
7. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial suspectibility Tests; Approved-Standard-Nineth Edition; Clinical and Laboratory Standards document M100-S18, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898; USA, 2008: 183.
8. **Cramton, S. E., Götz, F.** Biofilm development in staphylococcus. In Ghannoun, M., O`Toole, G. A. (eds) Microbial biofilms, ASM Press, Washington, DC, 2004, 64-84. ISBN 1-55581-294-295.
9. **Donlan, R. M.** Biofilms and device-associated infections. Emerg Infect Dis, 2001, 7, 2, 277-281.
10. **Fitzpatrick, F., Humphreys, H., O`Gara, J. P.** The genetics of staphylococcal biofilm formation – will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? Clin Microbiol Infect, 2005, 11, 12, 967-973.
11. **Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S., Stoodley, P.** Survival strategies of infectious biofilms. Trends in Microbiology, Volume 13, Issue 1, January 2005, Pages 34-40.
12. **Gattringer, R., Nikš, M., Ostertág, R., Schwarz, K.,**et al. Evaluation of MIDITECH automated colorimetric MIC reading for antimicrobial susceptibility testing. Antimicrob Chemother, 2002, 49, 4, 651-659.
13. **Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., Stoodley, P.** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, Nature Rewiews Microbiology, 2004, 2, 2, 95-108.
14. **Holá, V., Růžička, F.** Biofilmové infekcie močových katétrů. Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie, 2008, 2, 47-52.
15. **Holá, V., Růžička, F., Tejkalová, R., Votava, M.** Stanovení citlivosti k antibiotikům u biofilmpozitívních forem mikroorganizmů. Klin mikrobiol inf lék, 2004, 10, 5, 218-222.
16. **Knobloch, J. K. M., von Osten, H., Horstkotte, M. A.,** et al. Minimal attachment killing (MAK): a versatile method for susceptibility testing of attached biofilm-positive and – negative *Staphylococcus epidermidis*. Med Microbiol Immunol, 2002, 191, 107-114.
17. **LaPlante, K. L., Mermel, L. A.** In vitro activities of Televancin and Vancomycin against biofilm-producing *Staphylococcus aureus, S. epidermidis*, and *Enterococcus faecalis* strains. Antimicrob Agens Chemother, 2009, 53, 7, 3166-3169.
18. **Murray, P. R., Baron, E. J., Landry, M. L., Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A.** Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC: 2007. 1267. ISBN 1-55581-371-2
19. **Nishimura, S., Tsurumoto, T., Yonekura, A., Adachi, K., Shindo, H.** Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms isolated from infected total hip arthroplasty cases. J Orthop Sci, 2006, 11, 46-50.
20. **Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., Read, R. R.** Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can J Vet Res, 2002, 66, 2, 86-92.
21. **Pettit, K. R., Weber, Ch. A., Kean, M. J., Hoffmann, H.,** et al, Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49, 7, 2612-2617.
22. **Pettit, K. R., Weber, Ch. A., Pettit, R. G.** Application of a high throughput alamar blue biofilm susceptibility assay to *Staphylococcus aureus* biofilms. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2009, 8, 28,
23. **Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J., Ziebuhr, W.** Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesion expression in biofilm – forming *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agens Chemother, 2000, 44, 12, 3357-3363.
24. **Rohde, H., Burandt, E. C., Siemssen, N., Frommelt, L.,** et al. Polysacharide intercellular adhesion or protein factors in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus isolated from prosthetic hip and knee joint infections. Biomaterials, 2008, 28, 1711-1720.
25. **Shanks, R. M. Q., Donegan, N. P., Graber, M. L, Buckingham, S. E.,** Heparin stimulates Staphylococcus aureus biofilm formation. Infect Imun, 2005, 73, 8, 4596-4606.
26. **Shanks, R. M. Q., Sargent, J. L., Martinez, R. M., Graber, M. L.,** et al. Catheter lock solutions influence staphylococcal biofilm formation on abiotic surfaces. Nephrol Dial Transplant, 2006, 21, 8, 2247-2255.
27. **Smeltzer, M., Nelson, C., Evans, R.** Biofilms and aseptic losening. In Shirtliff, M., Leid J. (eds.) The role of Biofilms in device – related infections, Springer, Berlin, Heidelberg, 2009, 57 – 74. ISBN 978-3-540-68119-9.
28. **Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V, Di Bonaventura, G.,** et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and

Epidemiologie 2-010 22.4.2010 7:48 Str. 87
proLékaře.cz | 29.12.2026

practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS 2007, 115, 891-899.
29. **Stewart, P. S.** Mechanism of antibiotic resistance in bacterial biofilms. Int J Med Microbiol. 2002, 292, 2,107-113.
30. **Stewart, P. S., Mukherjee, P. K., Ghannoum, M. A.** Biofilm antimicrobial resistance. In Ghannoum, M., OęToole, G. A. (eds.) Microbial biofilms, ASM Press, Washington, DC, 2004, 250-268. ISBN 1-55581-294-5.
31. **Toledo-Arana, A., Merino, N., Vergara-Irigaray, M.,** et al. I. *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system. Bacteriol, 2005, 187, 15, 5318-5329.
32. **Widmer, A. F., Frei, R., Rajacic, Z., Zimmerli, W.** Correlation between *in vivo* and *in vitro* efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. J Infect Dis, 1990, 162, 96–102.
33. http://www.ethoxsts.com/biofilm_anti-microbial.html

Projekt bol finančne podporovaný grantom MŠ SR VEGA 1/4253/07.

Ďakujeme za technickú spoluprácu V. Augustovičovej, G. Skýpalovej a Ing. J. Havelovej.

Do redakce došlo 10. 7. 2009.

Prof. MUDr. Daniela Kotulová, PhD.
Mikrobiologický ústav LF UK a FBsP
Sasinkova 4/II.
811 08 Bratislava
Slovenská republika
e-mail: daniela.kotulova@fmed.uniba.sk

OSOBNÍ ZPRÁVY

Zemřel prof. MUDr. Jiří Horáček, CSc. (24. 3. 1941 – 28. 3. 2010)



V Květnou neděli, 28. března 2010, zemřel v královéhradecké fakultní nemocnici, které zasvětil svůj odborný život a které byl věrný až do doby odchodu na zasloužený odpočinek, významný český mikrobiolog a virolog, výborný učitel, kolega a lékař, profesor lékařství Univerzity Karlovy Jiří Horáček. Profesor MUDr. Jiří Horáček se narodil na počátku jara, 24. března 1941, v Plzni. Záhy se rodina přestěhovala do Hradce Králové, který pan profesor považoval „za svůj" a hrdým „Hradečákem" již zůstal až do smrti.

Jiří Horáček vystudoval gymnázium J. K. Tyla, kde maturoval v roce 1959. Po maturitě nastoupil na studium všeobecného lékařství hradecké lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, kde promoval v roce 1965. Pro svůj zdravotní handicap se ihned orientoval na práci v laboratořích a zvolil si druhou dámu svého srdce – mikrobiologii. Tou první a doživotní láskou byla jeho žena – rovněž lékařka – Miluška (1942), se kterou spojil svůj život v roce 1964. V roce 1965 se manželům Horáčkovým narodil syn Jiří, v roce 1970 dcera Jana, která si zvolila stejnou kariéru, jako rodiče.

Profesor Horáček nastoupil po promoci na Katedru mikrobiologie LF v Hradci Králové a po roce přestoupil na stejný obor, do laboratoří hradecké fakultní nemocnice. Zde rostl přes odborné a vědecké hodnosti (1979 – kandidát věd, 1992 – docent lékařství pro obor mikrobiologie, 1998 – profesor lékařství pro obor mikrobiologie) a aprobace až do funkce přednosty Ústavu mikrobiologie FN a LF UK v Hradci Králové (1995–2003), který vznikl sloučením katedry mikrobiologie lékařské fakulty a oddělením klinické mikrobiologie fakultní nemocnice. Profesor Horáček převzal štafetu od profesora Miroslava Hejzlara a dále budoval prestižní moderní diagnostické a výukové pracoviště.

I když hlavním zaměřením profesora Horáčka byla virologie (jeho zásadní práce se týkaly izolace cytomegaloviru), snažil se obor rozvíjet v celé šíři (mikrobiologie, parazitologie, virologie, mykologie, imunologické aspekty mikrobiologie) s technikami, jež umožňovaly nejen přesnou rychlou diagnostiku, ale především odrážely trendy ve světové mikrobiologii a klinikům poskytovaly validní, se zahraničím srovnatelná data. Aktivně se podílel na zázemí diagnostiky patogenů limitujících chirurgické výkony a stavy s poruchou imunokompetence (kardiochirurgie, transplantační medicína orgánů, buněk i tkání), publikoval mnoho prací v odborné literatuře, byl autorem učebních textů. Pro svou velkorysost byl oblíbeným učitelem i examinátorem u studentů všech typů studia, včetně doktorandských, případně habilitačních a profesorských řízení. Byl členem redakčních rad několika odborných časopisů, organizátorem odborných setkání českých a slovenských mikrobiologů, členem českých i zahraničních odborných společností.

Pan profesor MUDr. Jiří Horáček, CSc., zemřel čtyři dny po svých 69. narozeninách, obklopen svými nejbližšími, které vždy oddaně miloval.

S panem profesorem se rodina a nejbližší přátelé rozloučili 1. dubna 2010.

Čest jeho památce!

MUDr. Zbyněk Veselský, Ph.D.