

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2017

Lenka Fikejzlová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko – technologická

Mikrobiální osídlení nehojících se ran

Lenka Fikejzlová

Bakalářská práce

2017

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lenka Fikejzlová**  
Osobní číslo: **C14198**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Název tématu: **Mikrobiální osídlení nehojících se ran**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši na dané téma.
2. V rešerši se zaměřte na typy nehojících se ran a na mikroorganismy, které se nejčastěji vyskytují v těchto ranách.
3. Popište faktory ovlivňující hojení ran.
4. Zaměřte se na biofilm v chronických ranách.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Iveta Brožková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

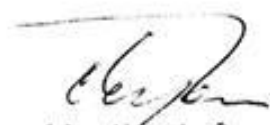
Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 11/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnici Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 16. 6. 2017

Lenka Fikejzlová

## Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce paní Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. za její nesmírnou ochotu, trpělivost, cenné rady a znalosti, které mi poskytla při vypracovávání této bakalářské práce. Velice děkuji za její obětavý přístup po celou dobu tvorby mé bakalářské práce.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zaměřuje na popis nehojících se ran a mechanismus jejich hojení. Zabývá se mikroby, které nejčastěji osidlují chronické rány. Další část je zaměřena na tvorbu biofilmu v nehojících se poraněních.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Biofilm, bakterie, nehojící se rána, faktory ovlivňující hojení

## **TITLE**

Presence of microorganisms in non-healing wounds

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis focuses on the description of non-healing wounds and the mechanism of their healing.

It deals with microbes that most often settle for chronic wounds. The next part is focused on biofilm formation in non-injurious injuries.

## **KEYWORDS**

Biofilm, bacteria, non-healing wound, factors influencing healing

# OBSAH

## SEZNAM ILUSTRACÍ

## SEZNAM GRAFŮ

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

<b>ÚVOD</b> .....	13
<b>1 Nehojící se rána</b> .....	14
1.1 Hodnocení nehojících se ran .....	15
1.1.1 Hloubka a velikost rány .....	15
1.1.2 Lokalizace rány .....	15
1.1.3 Spodina rány .....	15
1.1.4 Okraje rány .....	16
1.1.5 Ložisko rány .....	16
1.1.6 Přítomnost nekrotické tkáně .....	16
1.1.7 Exsudát.....	17
1.1.8 Infekce .....	17
1.1.9 Bolest .....	17
1.2 Typy nehojících se ran .....	17
1.2.1 Trofické vředy.....	18
1.3 Nejčastěji se vyskytující chronické rány.....	18
1.3.1 Bércové ulcerace venózní etiologie .....	18
1.3.2 Bércové ulcerace arteriální etiologie .....	19
1.3.3 Dekubity.....	19
1.3.4 Neuropatické defekty (jako důsledek Diabetes mellitus) .....	20
1.3.5 Kožní vředy v terénu lymfedému .....	21
<b>2 Faktory ovlivňující hojení ran</b> .....	22
2.3 Hojení rány .....	22
2.3.1 Fáze hojení rány .....	22



2.4	Hojení chronické rány .....	23
2.5	Rozdělení faktorů ovlivňujících hojení ran.....	24
2.5.1	Systémové faktory .....	24
2.5.2	Lokální faktory .....	27
3	<b>Biofilm</b> .....	30
3.1	Tvorba biofilmu .....	31
3.1.1	Fáze tvorby biofilmu.....	32
3.2	Struktura biofilmu .....	33
3.2.1	Interakce částic .....	34
3.3	Techniky odstraňování biofilmu z chronických ran.....	34
3.3.1	Debridement.....	35
4	<b>Nejčastěji nalézané mikroorganismy v chronických ranách</b> .....	37
4.1	GRAMPOZITIVNÍ MIKROORGANISMY .....	38
4.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	38
4.1.2	Koaguláza negativní stafylokoky v chronických ranách .....	40
4.1.3	<i>Streptococcus pyogenes</i> .....	41
4.1.4	<i>Enterococcus sp.</i> .....	42
4.2	GRAMNEGATIVNÍ MIKROORGANISMY .....	42
4.2.1	<i>Escherichia coli</i> .....	42
4.2.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	43
4.2.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	44
4.2.4	<i>Acinetobacter baumannii</i> .....	45
4.2.5	<i>Enterobacter sp.</i> .....	45
4.2.6	<i>Proteus mirabilis</i> .....	45
4.2.7	<i>Morganella morganii</i> .....	46
5	<b>ZÁVĚR</b> .....	47
6	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	48

## **SEZNAM ILUSTRACÍ**

<b>Obrázek 1</b> Lokalizace vředů na místech s velkým tlakem. (Yotsu <i>et al.</i> , 2014). .....	29
<b>Obrázek 2</b> 5 fází životního cyklu biofilmu (Gajdošová <i>et al.</i> , 2015). .....	33

## **SEZNAM GRAFŮ**

<b>Graf 1</b> Izolované druhy bakterií od pacientů s chronickými ulceracemi. (Enea Gino <i>et al.</i> , 2017). .....	37
--	----

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

*A. baumannii* – *Acinetobacter baumannii*

ADL – aktivita každodenního života (activity daily living)

BMI – index tělesné hmotnosti (body mass index)

*C. freundii* – *Citrobacter freundii*

Ca – vápník (*calcium*)

Cu – měď (*cuprum*)

CoNS – koaguláza negativní stafylokoky (coagulase-negative staphylococci)

CVI – chronická žilní insuficience (chronic venous insufficiency)

DEAC – difúzně adherentní *Esherichia coli* (diffuse-adhering *Esherichia coli*)

DFU – diabetická ulcerace na nohou (diabetic foot ulcer)

DIS – diseminovaná intravaskulární koagulace (disseminated intravascular coagulation)

DM – Diabetes mellitus

DU – dekubitus

*E. aerogenes* – *Enterobacter aerogenes*

*E. cloacae* – *Enterobacter cloacae*

*E. coli* – *Escherichia coli*

*E. faecalis* – *Enterococcus faecalis*

*E. sakazakii* – *Enterobacter sakazakii*

EAEC – enteroadherentní *Esherichia coli* (enteroadherentic *Esherichia coli*)

EaggEC – enteroagregativní *Esherichia coli* (enteroagregative *Esherichia coli*)

ECM – extracelulární matrix (extracellular matrix)

EIEC – enteroinvazivní *Esherichia coli* (enteroinvazive *Esherichia coli*)

*Enterobacter sp.* – *Enterobacter species*

EPEC – enteropatogenní *Esherichia coli* (enteropathogenic *Esherichia coli*)

EPS – extracelulární polymerní substance (extracellular polymeric substances)

ESBL – bakterie produkující širokospektré  $\beta$ -laktamázy (Extended-spectrum beta-lactamases)

ETEC – enterotoxigenní *Esherichia coli* (enterotoxigenic *Esherichia coli*)

EWMA – Evropská asociace společností hojení ran (European Wound Management Association)

Fe – železo (*ferrum*)

HIV – virus nedostatečné lidské imunity (human immunodeficiency virus)

IL-1 – interleukin-1

K – draslík (*kalium*)

*K. oxytoca* – *Klebsiella oxytoca*

*K. pneumoniae* – *Klebsiella pneumoniae*

*M. morgani* – *Morganella morgani*

MDRO – multirezistentní organismy (Multi-Drug Resistant Organisms)

MDRPA – multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*

Mg – hořčík (*magnesium*)

MRSA – methicillin rezistentní *Staphylococcus aureus* (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)

MRCoNS – methicillin rezistentní koaguláza negativní stafylokoky (Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci)

Na – sodík (*natrium*)

non-MDRO – citlivé organismy vůči antibiotickým organismům

*P. aereginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*

*P. mirabilis* – *Proteus mirabilis*

*P. vulgaris* – *Proteus vulgaris*

*S. agalactiae* – *Streptococcus agalactiae*

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

*S. auricularis* – *Staphylococcus auricularis*

*S. capitis* – *Staphylococcus capitis*

*S. caprae* – *Staphylococcus caprae*

*S. cohnii* – *Staphylococcus cohnii*

*S. epidermidis* – *Staphylococcus epidermidis*

*S. haemolyticus* – *Staphylococcus haemolyticus*

*S. hominis* – *Staphylococcus hominis*

*S. lugdunensis* – *Staphylococcus lugdunensis*

*S. marcescens* – *Serratia marcescens*

*S. maltophilia* – *Stenotrophomonas maltophilia*

*S. pyogenes* – *Streptococcus pyogenes*

*S. saccharolyticus* – *Staphylococcus saccharolyticus*

*S. saprophyticus* – *Staphylococcus saprophyticus*

*S. schleiferi* – *Staphylococcus schleiferi*

*S. schleiferi* subsp. *Schleiferi* – *Staphylococcus schleiferi* subspecies *Schleiferi*

*S. simulans* – *Staphylococcus simulans*

*S. warneri* – *Staphylococcus warneri*

*S. xylosus* – *Staphylococcus xylosus*

STEC – verotoxické *Esherichia coli* (schiga-like toxin *Esherichia coli*)

subsp. – poddruh (*subspecies*)

VLU – venózní ulcerace (venous leg ulcer)

VRE – vankomycin rezistentní enterokoky (vankomycin resistant *Enterococcus*)

Zn – zinek (*zinkum*)

## ÚVOD

Nehojící se rány jsou závažným problémem ve zdravotnictví. Jedná se o poškozené tkáň vykazující projevy komplikací, protože normální reparativní proces byl narušen.

Mezi faktory, které nejčastěji ovlivňují proces zhojení, patří správná počáteční diagnóza, dodržení předepsaných postupů pro péči o ránu, infekce a přidružená onemocnění, jako jsou diabetes mellitus a ischemické choroby.

Taková onemocnění zapříčiňují vznik nejčastějších typů nehojících se poranění, například diabetické nohy, ischemických, venózních a arteriálních ulcerací.

Nehojící se rány jsou vhodným prostředím pro vznik biofilmu, díky neustálému přísunu živin a vlhkým podmínkám. Bakterie přítomné v ranách mohou existovat v latentní fázi, aniž by se musela jejich přítomnost fyziologicky projevit. Problém nastává, když kolonizující bakterie začnou tvořit EPS biofilm, v němž jsou odolné vůči antimikrobiálním látkám. Proto je nutné biofilm z poranění odstranit s minimální traumatizací pacienta.

## 1 Nehojící se rána

Chirurgie definuje pojem rána jako porušení epidermální integrity. Působením zevního vlivu dochází k porušení pokožky a měkkých tkání, tím vzniká akutní rána. Normální proces hojení je u tohoto typu rány narušen a akutní rána se stává ranou chronickou. Dřívější označení chronická rána vystihovalo sekundárně se hojící ránu, jež se po dobu 6 až 9 týdnů nehojí, a to ani při vhodných léčebných postupech (Stryja, 2008).

Konzes českých odborníků a odborných společností ustanovil, že pojem chronická rána označuje sekundárně hojící se poranění, jež po dobu čtyř a více týdnů nevykazuje známky hojení i přes adekvátní terapii. Zde vzniká konflikt mezi tuzemskou a cizí literaturou. I přes to však tento pojem zohledňuje pouze časový faktor hojení, nikoliv stav rány, příčinu nebo prognózu, proto bylo doporučeno Evropskou asociací společností hojení ran (EWMA) v květnu roku 2010 místo označení chronická rána užívat termín nehojící se rána (non-healing wound) (Stryja, 2010).

Taková rána vykazuje projevy komplikací, protože normální reparativní proces byl narušen. Nejčastějšími příčinami jsou přidružené infekce a onemocnění, či mikrotraumatizace pokožky, která například z důvodu ischemizace má předpoklad k obtížnému hojení. Při ošetřování nehojící se rány je důležité zajistit terapii bolesti, kontrolu raného exsudátu, léčbu infekce, optimální vlhkost v ráně, která podporuje hojivé a opravné procesy a aseptickou práci zamezit opětovným infekcím (Stryja, 2008).

V případě neléčivé rány může být proces hojení zastaven v kterékoliv fázi, většinou tomu tak bývá u proliferační fáze. Mediátory zastavení hojivého procesu mohou poukazovat na poškození zánětlivých buněk, růstových faktorů, proteáz, buněčných nebo extracelulárních faktorů (Jaul, 2009).

Mezi klinické příznaky nehojících se ran patří absence zdravé granulační tkáně, přítomnost nekrotické a nezdravé tkáně v spodině rány, nadbytek exsudátu, nedostatečné zásobení krví, selhání opakované epitelizace, cyklická nebo přetrvávající bolest, opakující se porucha rány a klinická nebo subklinická infekce (Enoch, 2006).

## **1.1 Hodnocení nehojících se ran**

Klinická anamnéza by měla zahrnovat informace o velikosti vředu, recidivitu, traumatu v anamnéze, rodinné anamnéze tvorby ulcerací, charakteristice vředů (lokalizace, bolest, zápach, exsudát, výtok), teplotě okolí rány, přidružených nemocech (př. Diabetes mellitus, onemocnění periferních cév, ischemická choroba srdeční, cerebrovaskulární příhody, neuropatie, choroby pojivové tkáně (jako je revmatoidní artritida), výskytu křečových žil, hluboké žilní trombózy, předchozích žilních nebo arteriálních zákrocích, zda pacient kouří, či jaké užívá léky a jestli je pacient alergický na některá léčiva nebo obvazy (Stryja, 2008).

### **1.1.1 Hloubka a velikost rány**

Velikost rány by měla být posouzena při první prohlídce a poté hodnocena pravidelně. Od rozměrů poranění se odvíjí doba hojení a obecně platí, že čím větší rána, tím déle trvá její zhojení. U hlubokých poranění je navíc nutné zacelení poškozených podkožních tkání. Přesné metody měření hloubky rány nejsou praktické ani dostupné v rutinní klinické praxi. I přes to by však měla být zhodnocena přibližná měření největší hloubky poranění, kvůli vyhodnocení průběhu reparačního procesu (Enoch, 2006).

### **1.1.2 Lokalizace rány**

Posouzení umístění ulcerace také napomáhá správné diagnóze. Například diabetické ulcerace na nohou (DFU) vznikají často v oblastech, které jsou vystaveny velkému tlaku, jako jsou plosky nohou. Venózní ulcerace se většinou vyskytují v oblasti paty a Achillovy šlachy. Právě nejhůře probíhá proces hojení ran nad kostními prominencemi a v místech se sníženou výživou a nedostatkem tukové tkáně (predilekční místa dekubitů a místa namáhaná pohybem) (Enoch, 2006).

Pokud je rána nevhodně lokalizována, například v blízkosti rekta, je kvůli hrozící fekální kontaminaci prováděna kolostomie. Výkaly jsou pak odváděny kolostomickým řezem v oblasti břicha (Jaul, 2009).

### **1.1.3 Spodina rány**

Normálně dobře se hojící rána má čistou, granulující spodinu se známkami epitelizace. Naopak nekrotická spodina s krevními sraženinami, fibrinovými nálety a povlaky značně zpomaluje hojení (Stryja, 2008).



#### **1.1.4 Okraje rány**

Vyšetření okraje rány může pomoci identifikovat její etiologii. Okraje rány se rozlišují podle ohraničeného okraje (výrazně odlišného od spodiny rány), neohraničeného (neboli splývavého), edematózního, podminovaného, atonického, nekrotického, hyperkeratotického, macerovaného, erytematózně hypergranulovaného a epitelizujícího okraje. Například venózní vředy na nohou mají zpravidla mírně nakloněné hrany okrajů, zatímco arteriální vředy jsou často ostře ohraničené a válcové, nebo mají obrácené okraje (vyrolované směrem ven) a vyvolávají podezření na maligní onemocnění. V takovém případě by měla být provedena biopsie. Proces regenerace je ještě více zpomalen, pokud jsou navíc okraje rány podminované, tuhé, neostré a ischemické.

Podminování okraje rány se zjišťuje digitálním vyšetřením nebo použitím sondy. Určuje se hloubka a rozsah dutin a píštělí. Podminované oblasti by měly být zabaleny vhodným obvazem pro ulehčení hojení ulcerace (Enoch, 2006).

#### **1.1.5 Ložisko rány**

Zdravá granulační tkáň má růžovou barvu, která indikuje hojení. Nezdravá granulace má tmavě červenou barvu, při kontaktu často krvácí a může naznačovat přítomnost infekce v poranění. Z takových ran by měly být provedeny stěry a mikrobiologická kultivace by měla prokázat možnou přítomnost dané bakterie a identifikovat kmen v ulceraci. Nadměrná granulace může mít také souvislost s infekcí, nebo indikovat zastavení reparačního procesu. Takové rány bývají ošetřeny zavedením katetru s dusičnanem stříbrným nebo topickými steroidními přípravky. Chronické rány mohou být pokryty bílým nebo žlutým lesklým či fibrinózním povlakem, který je nutno odstranit, aby se obnovilo hojení.

Podle typu tkáně, na němž se rána nachází, je možné posoudit celkovou dobu hojení a rizikové faktory, které jej mohou zkomplikovat (Enoch, 2006).

#### **1.1.6 Přítomnost nekrotické tkáně**

Ložisko rány může být pokryto nekrotickou tkání, tvořenou nefunkčními odumřelými buňkami kvůli sníženému zásobení krví s následnou hypoxií. Mrtvá tkáň má obvykle smetanovou až žlutou barvu a nekrotická tkáň bývá suchá, tvrdá a černá. Taková tkáň brání hojení. Navíc nekrotická tkáň může také obsahovat patogenní či podmíněně patogenní mikroorganismy, a proto její odstranění napomáhá předcházet infekci rány. Někdy nekrotické buňky adherují k povrchu spodiny ulcerace a jejich odstranění bývá obtížné (Enoch, 2006).

### **1.1.7 Exsudát**

Exsudát rány může být serózní, serosangvinózní nebo krvavý. Jeho množství je obvykle klasifikováno podle promáčení obvazu. Rozlišuje se jako minimální (obvázání rány je suché), střední (mokrý obvaz) a úplné (promočení všech obvazových vrstev). Nadměrný exsudát může být způsoben infekcí rány nebo silným otokem okolí poranění a může tak komplikovat hojení ran.

Exsudát vzniká procesem exsudace, přičemž kapilární stěnou prostupuje voda, bílkoviny i buněčné složky. Kapiláry jsou dilatované, poté nastává peristatická hyperémie a zvětšují se rozestupy mezi endotelovými buňkami.

Produkce exsudátu by měla být kontrolována použitím obvazů vyráběných za tímto účelem (Enoch, 2006).

### **1.1.8 Infekce**

Všechny otevřené rány jsou kolonizovány mikroorganismy. Kultivace bakterií ze stěrů ran a jejich vyšetření na rezistenci vůči antibiotikům je však prováděno pouze, pokud ulcerace vykazuje klinické příznaky infekce. Klasickým příznakem infekce je zvýšená teplota rány, zarudnutí, otok a bolest. Další známky infekce zahrnují zvýšenou produkci exsudátu, prodloužené hojení, krvácení při kontaktu s ránou, zápach a abnormální granulační tkáň. Léčba antimikrobiálními látkami by měla být řízena mikrobiologickými výsledky, místními modely a endemickými poznatky mikrobiální rezistence (Enoch, 2006).

### **1.1.9 Bolest**

Bolest je charakteristickým znakem hojících se i nehojících se ran. Bolest může být způsobena nociceptivními i neuropatickými podněty. Občasná bolest je často spojena s odstraněním obvazů nebo jejich novou aplikací a může vyžadovat užívání analgetik před úpravou obvazu. Typicky u nehojících se ran může vzniknout konstantní přetrvávající bolest. Povaha a druh bolesti by měla být specifikována a vhodně léčena (Enoch, 2006).

## **1.2 Typy nehojících se ran**

Typy ran lze dělit z různých hledisek, nejčastěji se dělí dle etiologie na vředy trofické, které vznikly na základě angiopatie nebo neuropatie, rány související s traumatem (př. komplikované pooperační rány, popáleniny), poranění související s nadměrným tlakem a nehojící se rány z důvodu infekce (Stryja, 2010).

### 1.2.1 Trofické vředy

Pojem trofický vřed vyjadřuje pouze příznak různých onemocnění, lze jej také nazvat ulcerací. Vznik ulcerace obecně může být následkem mnoha příčin. Příčiny ulcerace mohou být cévní (žilní, arteriální, lymfatické, vaskulitida), neuropatické (například diabetes, spina bifida, malomocenství), metabolické (například diabetes, dna), nebo onemocnění pojivových tkání (například revmatoidní artritida, sklerodermie, systémový lupus erythematosus), pyoderma gangrenosum (často odraz systémové poruchy), hematologická onemocnění [poruchy červených krvinek (například srpkovité onemocnění), poruchy bílých krvinek (leukémie), poruchy trombocytů (například trombocytóza)], dysproteinémie (kryoglobulinémie, amyloidóza), imunodeficience (HIV, imunosupresivní terapie), neoplastické (karcinom bazálních buněk, skvamózních buněk, metastatické onemocnění), infekční (bakteriální, plísňové, virové), panikulitida (například necrobiosis lipoidica), traumatické (např. tlakové vředy, radiační poškození), iatrogenní (po podání nesprávných léčiv), fiktivní (sebepoškozování, „dermatitis artefacta“) a jiné (například sarkoidóza) (Grey *et al.*, 2006).

Vznik angiopatické ulcerace může souviset s makroangiopatií neboli aterosklerózou končetinových tepen, mikroangiopatií, zapříčiněnou diabetem, či autoimunitním onemocněním, a flebopatií, vzniklou ze žilní nedostatečnosti (Stryja, 2010).

### 1.3 Nejčastěji se vyskytující chronické rány

Plantární ulcerace jsou nejběžněji viděny pod halluxem na první a páté metatarzální hlavě a pod patou (Grey *et al.*, 2006).

Nejčastější typy nehojících se ran jsou ulcerace tlakové, diabetické, ischemické a žilní. S mnohými z těchto ran může pacient žít po celý život, ale pokud nebudou ošetřeny, mohou výrazně komplikovat zdravotní stav a vést až ke smrti. Často, když dojde ke zranění nebo vytvoření ulcerace, zejména pak u starších osob, akutní rány přecházejí v chronické. Je to zapříčiněno tím, že není věnována dostatečná pozornost faktorům, které tuto věkovou skupinu ohrožují (Jaul, 2009).

#### 1.3.1 Bércové ulcerace venózní etiologie

Více než 70 % všech defektů dolních končetin vzniká v důsledku žilních poruch, nejčastěji jako komplikace chronické žilní insuficience (CVI) v důsledku žilní hypertenze, při níž není plně dosaženo žilního návratu k srdci. Bércový vřed žilního původu (ulcus cruris venosum) bývá hlavně lokalizován na vnitřním a zevním kotníku. Ulcerace má nepravidelný

tvář, povleklou mělkou spodinu s hladkými okraji a patrnými varixy v okolí. Kožní změny s příznaky CVI, jako jsou edém bérce, se projevují hyperpigmentací, varixy, erytémem, petechiemi, liposklerózou a ekzematizací (Rozehnalová *et al.*, 2008).

Ulcus cruris venosum vzniká zejména u starších osob, při vyšší tělesné hmotnosti, závažném poranění dolní končetiny, vrozené či získané nedostatečnosti žilního zásobení dolních končetin, trombóze hlubokých žil, chronických lokálních změnách kůže, předchozím chirurgicko-cévním zákroku na křečových žilách a při nezdravém životním stylu (Rozehnalová *et al.*, 2008).

### **1.3.2 Bércové ulcerace arteriální etiologie**

Arteriální etiologie se vyskytuje u 5–10 % defektů dolních končetin. Bércový vřed tepenného původu (ulcus cruris arteriosum) nejčastěji zapříčiňuje arteriální okluze při ischemické chorobě dolních končetin. Tepenné vředy bývají většinou menší, mnohočetné a silně bolestivé. Velikost uzávěru odpovídá rychlosti vzniku a velikosti ulcerace. Jejich umístění nemusí být lokalizované jen pretibiálně a laterálně na bérce, ale i na nártách, prstech a na patách (Rozehnalová *et al.*, 2008).

### **1.3.3 Dekubity**

Dekubity jsou tlakové vředy. Lze se s nimi setkat nejen u osob staršího věku, ale i při systémových onemocněních, jako je terminální srdeční selhání se závažným edémem nohou, respirační selhání se sníženou periferní oxygenací a pokročilým selháním ledvin často s těžkým edémem, Alzheimerova choroba nebo recidivující mrtvice, kdy pacient je dlouhodobě upoután na lůžko (Jaul, 2009).

Dekubitus označuje defekt pokožky a tkání, zapříčiněný přímým tlakem nebo třecími silami. Buněčné poškození vzniká lokálním působením tlaku na tkáň, což narušuje mikrocirkulaci, kterou následuje hypoxie. Krevní oběh v kapilárách je zastaven, dochází k ischemii a vytvoření nekrotizace. Proleženiny postupují vždy z hloubky tkáně směrem k povrchu pokožky a jejich vznik je velmi rychlý. Zasaženy mohou být jak hluboké struktury (svaly), tak i šlachy a kosti. Postižení se týká především tkání mezi podložkou a kostním výčnělkem (predilekční místa), patří sem hlavně sacrum, paty, oblast nad sedací kostí a kotníky (Stryja, 2008).

Klasifikace dekubitů dle Stirlinga má 4 stupně. První stupeň vystihuje neblednoucí překrvení kůže, erytém, mírný otok, zarudnutí a zduření postižené oblasti. Druhý je charakterizován tlakovou lézí celé pokožky, kdy se ztrácí její tloušťka, otokem, zduřením,

bledostí a poranění vypadá jako odřenina nebo puchýř. Obě tyto fáze jsou stále vratné. V třetím stupni jsou již zasaženy hlubší vrstvy, podkožní tkáň je poškozená a odumírá. Proleženina má vzhled kráteru s možností podminování okrajů. Změny jsou již nevratné a je nutný lékařský zákrok. V posledním stupni se objevuje nekróza, která může zasahovat až ke svalu, kosti a kloubu, rozsáhlá destrukce pokožky v mnoha případech spojená s infekcí (Stryja, 2008).

#### **1.3.4 Neuropatické defekty (jako důsledek Diabetes mellitus)**

Neuropatické ulcerace postihují pacienty s Diabetes mellitus a jsou nejtěžší formou syndromu diabetické nohy. U 85 % případů předchází amputaci dolních končetin diabetiků. Tyto defekty vznikají na základě mechanického působení tlaku a poruchy inervace dolních končetin, kdy je snížena citlivost nervových zakončení, takže nemocný nepociťuje adekvátní bolest a nevykazuje ochranné chování, díky tomu vzniká neuropatický vřed (Yotsu *et al.*, 2014).

Vzhled této ulcerace bývá okrouhlý, nebolestivý s hyperkeratotickým okolím. Následně se přidruží infekce a rána se zvětšuje (Stryja, 2008).

Ohraničená gangréna postupuje do hloubky, vznikají abscesy umístěné pod kalusem s malým vředem na povrchu. Tyto ulcerace se vytvářejí distálně od kotníku. I diabetické vředy mají pravidelné okraje a hlubokou spodinou rány a bývají provázeny celulitidis nebo osteomyelitidou. Pokud není přítomno onemocnění periferních cév, dochází k tvorbě granulační tkáně a rána secernuje mírné až střední množství exsudátu (Yotsu *et al.*, 2014).

Hojení těchto ran je velmi zdlouhavé a velmi často recidivuje. Bylo zjištěno, že neuropatické vředy se hojí asi dvakrát rychleji než neuroischemické a ischemické ulcerace (Yotsu *et al.*, 2014).

Podle hloubky poranění a přítomnosti infekce se neuropatické defekty dělí dle Wagnerovy klasifikace do pěti stupňů. První stupeň určuje povrchová ulcerace a postižení celé vrstvy kůže, nepřesahující do podkoží tkáně. V druhém stupni se setkáváme s hlubší ulcerací, lézemi, které postihují celou vrstvu epidermis a přesahují až do podkoží. Třetí stupeň charakterizuje hluboká ulcerace, jež může postihovat svaly, šlachy, kosti a je většinou spojená se závažnou infekcí (flegmona, absces, osteomyelitida, artritida). V předposledním stupni se vytvoří lokalizovaná gangréna a v posledním je již celá noha postižena gangrénou (Stryja, 2008).

DFU jsou jednou z nejzávažnějších a zhoršujících se komplikací diabetu (Yotsu *et al.*, 2014).

Celosvětově zůstává diabetická noha hlavním zdravotním, sociálním a ekonomickým problémem, který se projevuje v každé zemi. Lidé s největším rizikem ulcerace mohou být snadno identifikováni pečlivým klinickým vyšetřením nohou. Až u 25 % pacientů s cukrovkou se během života vyvinou ulcerace nohy a až u 2 % pacientů může dojít k amputaci, což je asi zhruba patnáctkrát více než u nediabetické populace. I dodnes zůstává Diabetes mellitus hlavní příčinou netraumatické amputace ve většině západních zemí (Hess, 2011).

### **1.3.5 Kožní vředy v terénu lymfedému**

Ulcus cruris lymphaticum je poměrně vzácný typ bérkové ulcerace. Vzniká zpravidla v oblasti primárního lymfedému, tedy vysokoproteinového otoku, u něhož je důležitá včasná léčba, protože postupně totiž vede k výrazné fibrotizaci podkoží (Navrátilová, 2003).

Zprvu se měkký otok vazivově přeměňuje v tuhý otok, přičemž nedochází k tvorbě kožní řasy (tlakem prstu se na kůži nevytvoří důlek). V takto postiženém místě může dojít k rozvoji bérkového vředu. Poměrně častá je bakteriální infekce, způsobená kmenem *Streptococcus pyogenes*, kdy se v podkoží tvoří erysipel, který v mnoha případech s oblibou recidivuje (Rozehnalová *et al.*, 2008).

## **2 Faktory ovlivňující hojení ran**

Většina typů poranění se bez obtíží hojí. Některé rány však podléhají faktorům, které proces zhojení ovlivňují a mohou se díky těmto vlivům stát chronickými. Vliv na průběh hojení ran mohou mít obecné i lokální vlivy, které se mohou navzájem podporovat a prodlužovat tak proces hojení. Obecně pro poranění platí, že čím větší velikost zranění, a čím starší rána je, tím déle a hůře se léčí. Nejdůležitější pro zacelení rány je dostatečná produkce kolagenu, tu může ovlivňovat hypoproteinémie, kortikosteroidy, ingekce, přidružená traumata, nedostatečné zásobení kyslíkem, hypovolémie, Diabetes mellitus, poškození vzniklé ozářením, stav imunity, kvalita péče, stav rány, léky, věk pacienta a dokonce i psychosociální aspekty. Pro správné zhojení rány je velmi důležité rozpoznání rizikových faktorů, což dovoluje stanovit počáteční správnou diagnózu s posouzením celkového stavu organismu, zjištění příčiny vzniku chronické rány, zajištění vhodné kauzální léčby, léčby bolesti a správného posouzení fáze hojení rány. Stanovení rizikových faktorů je také důležité i pro prevenci možné recidivy (Enoch, 2006).

### **2.3 Hojení rány**

Hojení ran je opravný proces skládající se z několika překrývajících se fází. Je to složitý biologický proces, který zahrnuje vzájemnou interakci zánětlivých buněk, růstových faktorů, cytosinů, enzymů (proteáz) a extracelulárních prvků. Jedná se o dynamický děj s katabolickými a anabolickými fázemi, zahrnující celulární, biochemické, prostorové děje s cílem zhojení rány. V kterékoli z těchto fází může dojít k narušení hojivého procesu, nejčastěji tomu však bývá ve fázi proliferace (Jaul, 2009).

#### **2.3.1 Fáze hojení rány**

Léčení je vysoce integrovaný fyziologický proces složený z několika odlišných, ale vzájemně souvisejících fází, do nichž patří hemokoagulace, fáze zánětu, proliferace a remodelování. Pro úspěšnou léčbu musí být hemostatické a zánětlivé mechanismy neporušené a mezenchymální buňky musí migrovat a proliferovat v zraněné oblasti. Musí

probíhat angiogeneze, epitelizace a syntetizování kolagenu tak, aby došlo ke správnému zhojení tkáně (Jaul, 2009).

Popis regenerace chronické rány vychází z modelu hojení akutního poranění. Aby došlo ke zdárnému zhojení rány, musí všechny reparační fáze proběhnout bez komplikací. Přípravná, neboli nultá fáze je účinná hemokoagulace. U akutní rány dojde k protkání fibrinem, koagulovaná krev zastaví krvácení, zajistí se dostatek zdrojů pro tvorbu primitivní mezibuněčné hmoty a vznikne trombus. Poté dochází k uvolnění růstových faktorů a cytokinů z trombocytů, jež umožní první fázi hojení. Nejdůležitějším procesem zánětu je debridement rány, neboli odstranění odumřelých buněk, buněčných částí a mezibuněčné hmoty, migrujícími makrofágy. Dojde k ohraničení případné infekce pohybujícími se granulocyty, které jsou společně s makrofágy výrazně pomnoženy na spodině rány. Tato fáze obvykle trvá 3 dny od vzniku zranění (Mathieue, 2006).

Správný průběh zánětu začíná proliferační (granulační, anabolickou) fází hojivého procesu. Je charakterizována neoangiogenezí a tvorbou granulační tkáně, která tvoří základ pro epitelizaci. Vytvoří se nové kapiláry, aby byla zajištěna výživa tkání živinami a kyslíkem. Fibroblasty se zmnoží a vytvářejí mezibuněčnou hmotu z primitivních kolagenových a elastických vláken a mezibuněčnou hmotu z fibronektinu a kyseliny hyaluronové. Okolí rány se překrvuje, buněčné elementy migrují podél nově vytvořených kapilár a tkáň v ráně granuluje (Jaul, 2009).

Spodina rány je červená, bohatě vaskularizovaná a tvorba exsudátu ustupuje. V případě, že by došlo ke změně barvy spodiny na šedou, či zelenou barvu, a rána by se začala by pvlékat, jednalo by se o stagnaci reparativního procesu z důvodu infekce (Stryja, 2008).

Konečnou fází hojení poranění lze nazvat maturací, remodelací nebo epitelizací. Od okrajů rány, nebo od epitelizačních ostrůvků uvnitř poranění, dochází postupně k epitelizaci. Přestavuje se mezibuněčná hmota, a to hlavně z kolagenních fibril. Z fibroblastů se stanou fibrocyty, což je jejich klidové stádium. Granulační tkáň ztrácí vodu, stahuje se, ubývá počet kapilár, epitel na povrchu jizvy zesiluje a mění se z růžové barvy na tmavě hnědou, posléze bělavou tkáň. Vytvoří se jizva. Proces hojení rány trvá ještě několik měsíců po uzavření poranění (Jaul, 2009).

## **2.4 Hojení chronické rány**

Pro hojení chronické rány je typické, že aktivita růstových faktorů, cytokinů a proteáz na povrchu rány je v nerovnováze. Jednotlivé fáze hojení tak na sebe optimálně nenasazují a reparace poranění se zastavuje. Na povrchu rány vzrůstá počet buněk, které nejsou schopny



se dále dělit a odumírají. Navíc jsou nehojící se rány často infikovány a dlouhodobě kolonizovány mikroorganismy. Proces hojení znesnadňuje i tkáňová ischemie, intersticiální otok, či nadměrná mechanická zátěž poranění (Stryja, 2010).

Hojení chronické rány mohou negativně ovlivnit vnitřní faktory, jako jsou vaskularizace (nedostatečná krevní zásoba), imunodeficity (infekce, DM), radioterapie, věk, nutriční stav (podvýživa, obezita), léky (imunosupresiva, kortikoidy), kouření, stres, nedostatek bílkovin, vitamínů či minerálů. Dále hojící proces ovlivňují zevní faktory, kam patří trauma, infekce, fyzikální vlivy (tlak, teplota) i chemické vlivy (Yotsu *et al.*, 2014).

Hojení u starších osob může být navíc negativně ovlivněno cévními změnami (ateroskleróza, atrofie epidermálních kapilár), sníženou funkcí jater (poruchy krevní srážlivosti), nedostatečnou funkcí imunitního systému a nedostatečnou výživou (Jaul, 2009).

Uzdravení chronických ran je často zkomplikováno vytvořením sinusu, či píštěle, kdy píštěl vznikne onemocněním konečníku nebo primárním onemocněním jiného orgánu a jeho následným kanálkovitým propojením s kůží (Bartoška, 2007).

Zhojení je také ovlivněno maligní transformací ve vředu, neboli Marjolinovým vředem (vřed vznikající v předchozí jizvě nebo benigním vředu), zánětem kostní dřene, který často bývá způsoben pyogenními mikroorganismy jako je *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* nebo *Streptococcus pyogenes*. Zacelení nehojících se ran dále může komplikovat systémová amyloidóza, což znamená poškození několika orgánů současně amyloidem. Hojení komplikují i heterotopické osifikace, deformace okolních kloubů, nerozpoznané malignity, kolonizace několika mikroorganismy rezistentními vůči antibiotikům, anémie, či sepse (Grey *et al.*, 2006).

## **2.5 Rozdělení faktorů ovlivňujících hojení ran**

Patologické faktory, které brání procesu hojení a přispívají k rozvoji nehojících se ran, lze dělit jako lokální faktory a systémové faktory, nebo na vnější a vnitřní (Jaul, 2009).

### **2.5.1 Systémové faktory**

Systémové faktory vychází z celkového stavu organismu. Je velmi důležité, aby byl zhodnocen celkový stav pacienta, dlouhodobá anamnéza, případně i návyky (př. kouření, návykové látky) a psychosociální faktory konkrétního pacienta (Grey *et al.*, 2006).

#### **2.5.1.1 Věk a mobilita pacienta**

Starší jedinci jsou ohroženi více faktory, které komplikují hojivý proces, než ostatní pacienti. Příčinou jsou fyziologické změny, jako je stárnutí kůže (snížená syntéza kolagenu),

imunitní stav a ateroskleróza, nebo přidružená onemocnění. Ve starším věku může dojít ke snížení aktivity zánětlivých buněk, růstových faktorů, transformačního růstového faktoru, což také zpomaluje proces regenerace. Rychlost zánětlivé reakce se výrazně snižuje, a to kvůli zpomalení migrace makrofágů do místa poranění. Pomalejší průběh má i angiogeneze a reepitelizace. Naproti tomu se úroveň aktivity matrixových metaloproteináz, které slouží pro rozklad intercelulárních proteinů, značně s věkem zvyšuje. U seniorů s nehojící se ránou je, kromě rány samotné, navíc nutno sledovat komorbiditu pacienta, aktivitu každodenního života (ADL), stav výživy, sociální podporu, etické přesvědčení a kvalitu života (Jaul, 2009).

#### **2.5.1.2 Výživový stav pacienta**

Hojení ran úzce souvisí s celkovým nutričním stavem. Proces regenerace je velmi energeticky a látkově náročný. U obézních pacientů se setkáváme s prodlouženým hojením ran, zejména díky špatné proteinové výživě a prokrvení tukové tkáně. Naproti tomu kachektičtí pacienti mívají problémy s nedostatečným zásobením kyslíkem a nedostatkem nutričních zásob. Poruchy výživy mohou být projevem i dalších onemocnění a stavů (pooperační malnutrice, malnutrice u starších jedinců, nádorová kachexie). Malnutrice se u pacientů projevuje snížením tělesné hmotnosti, úbytkem tukových rezerv, nebo poklesem koncentrace sérových proteinů (albumin, prealbumin, transferin). Nedostatek nutričních látek (hypoproteinemie) se podílí na inhibici fagocytózy a syntézy kolagenu a tím dochází k narušení fyziologického procesu hojení (Stryja, 2010).

#### **2.5.1.3 Nedostatek vitamínů a stopových prvků**

Velmi důležitou roli zastávají v mnoha tělesných procesech vitaminy a stopové prvky, které jsou důležité pro syntézu enzymů a hormonů. Z nejdůležitějších vitamínů lze uvést vitamín C, E, B, A, K a ze stopových prvků Cu, Fe, Zn, Mg, Na, K a Ca (Stryja, 2008).

#### **2.5.1.4 Systémová malignita a přidružená onemocnění**

Nejzávažnějšími komplikacemi při hojení ran jsou přidružená onemocnění jako Diabetes mellitus, hypertenze a imunodeficience. Diabetes mellitus zapříčiňuje vznik diabetických ulcerací a komplikuje jejich uzdravení. Fakt, že pacient trpí touto nemocí, neznamená nutně vznik vředu. Vznik poranění souvisí s pohlavím, věkem, dobou nemoci, komorbiditami, včetně retinopatie a nefropatie, hladinou glykovaného hemoglobinu, makro-vaskulárními komplikacemi, deformacemi nohou, návyky a zdravotní péčí. Některé studie dokonce prokázaly souvislost mezi vznikem DFU, hypertenzí a indexem tělesné hmotnosti (BMI).

Nedostatečné hojení mohou způsobovat i jiná onemocnění nebo dysfunkce. Proto by měly být pravidelně sledovány a posuzovány hladiny albuminu a prealbuminu, jako proteiny pro růst buněk, celkový počet lymfocytů a hladiny transferinu, které jsou ukazatelé malnutrice. Dále je nutno sledovat také množství hemoglobinu, aby mohla být správně posouzena schopnost krve přenášet kyslík a hodnotit funkci štítné žlázy, ledvin a jater (Yotsu *et al.*,2014).

Z dalších onemocnění komplikujících reparační procesy je dobré uvést ischemická onemocnění, periferní cévní onemocnění, různá nádorová onemocnění a hematologické poruchy, kam se řadí anémie a koagulopatie. Koagulopatie je krvácivý stav způsobený sníženou koncentrací nebo aktivitou plazmatických koagulačních faktorů. Koagulopatie lze rozlišovat na vrozené a získané. Mezi vrozené řadíme hemofilii (A i B) a Von Willebranovu chorobu a mezi získané patří porucha resorpce a využití vitamínu K a diseminovaná intravaskulární koagulace (DIS) (Yotsu *et al.*,2014).

#### **2.5.1.5 Šok z jakékoliv příčiny**

Opakovaně traumatizované rány a rány nedostatečně zásobené krví v důsledku edému se hojí pomalu nebo vůbec (Enoch, 2006).

#### **2.5.1.6 Chemoterapie a radioterapie**

Chemoterapie a radioterapie výrazně oslabují imunitní systém pacienta a porušují homeostázu. Imunitní systém oslabených osob pak není schopen se účinně bránit proti patogenům a mohou vznikat infekce a další onemocnění.

Radioterapie může způsobit vředy nebo změny na kůži, buď bezprostředně po ošetření, nebo až po ukončení léčby (Enoch, 2006).

#### **2.5.1.7 Imunosupresiva**

Při užívání cytostatik, antiflogistik, antihistaminik a imunosupresiv může taktéž dojít ke zpomalení procesu hojení (Enoch, 2006).

#### **2.5.1.8 Další systémové faktory**

Mezi další systémové faktory narušující hojení patří kortikosteroidy, antikoagulancie a dědičné poruchy neutrofilů, jako je například nedostatečná adheze leukocytů nebo zhoršená aktivita makrofágů (Enoch, 2006).

## **2.5.2 Lokální faktory**

Mezi lokální, neboli místní faktory se řadí zhodnocení funkce okolí rány, fyzikální vlivy, částečně i péče o zranění a správný postup ošetřujících lékařů a lékařského personálu. Kvalita péče se odvíjí od schopností a znalostí ošetřujících. Na základě posouzení zranění a stavu pacienta je důležité zvolit vhodné postupy a prostředky pro terapii a kompenzovat nežádoucí systémové faktory, jež by mohly narušit proces zhojení (Stryja, 2008).

### **2.5.2.1 Nedostatečné zásobování rány krví**

Prokrvení je pro proces zhojení důležité. Hypoperfúze (nedostatečné zásobení krví) může být způsobena arteriálními uzávěry nebo protahovanou vazokonstrikcí, hypotenzí, hypotermií a venózním městnáním na periférii. Pokud není k ráně přiváděno dostatečné množství krve, nastává hypoxie rány. To omezuje syntézu kolagenu (porucha síťování kolagenních vláken – porucha hydroxylace prolinu a lysinu) a růst epiteliálních buněk, což narušuje hojení a zvyšuje náchylnost k bakteriálním infekcím. Takto vzniká mnoho typů ran – diabetické vředy, nebo dekubity. Naopak, kdyby docházelo pouze k mírné hypoxii, byla by podporována angiogeneze (Stryja, 2010).

### **2.5.2.2 Zvýšené napětí kůže a porušení integrity pokožky**

Porušení integrity kůže je zejména zapříčiněno malignitou, traumatem, nebo cévními příčinami. Zvýšené napětí kůže je další rizikový faktor ohrožující správnou léčbu. Může být způsobeno, jak věkem, tak i nesprávnou péčí o ránu a její okolí. Buňky v poranění potřebují dostatečnou hydrataci, jinak vysychají a odumírají, proto se využívá speciálních krytí ran, která udržují v ráně vlhké prostředí, které umožňuje rychlejší a méně bolestivé hojení. Dochází totiž ke zvyšování migrace epidermálních buněk, jež podporují epitelizaci. Močová a fekální inkontinence může narušovat celistvost okolní kůže. Správná péče o čistotu rány a kůže je nezbytná pro úspěšnou terapii (Stryja, 2008).

### **2.5.2.3 Špatná chirurgická léčba**

Nevhodně provedený řez nebo sešití chirurgické rány může vést k dehiscenci zranění, neboli rozestupu. Nejčastěji je možné se s tímto problémem setkat po laparoskopických zákrocích. Důležitá je i kontrola dezinfekce chirurgických nástrojů a pomůcek (př. stehů), aby nedošlo k infikování rány rezistentními mikroorganismy a následné sepsi (Grey *et al.*, 2006).

#### **2.5.2.4 Špatná žilní drenáž**

Špatně zavedená žilní drenáž je dalším příkladem nevyhovující péče o pacienta (Grey *et al.*, 2006).

#### **2.5.2.5 Přítomnost cizích těles v ráně**

Pokud není poranění dostatečně vyčištěno a případně zbaveno nekrotizujících buněk, může dojít k vytvoření biofilmu a rozvinutí infekce v ráně. V případě nekrózy se rozlišují dva typy nekrotické tkáně – vlhká a suchá gangréna. Vlhká gangréna má vlhký vzhled a rozvlákněnou nekrotickou tkáň žluté barvy, zatím co suchá gangréna má vzhled suché, tuhé, kožovité tkáně, která může mít černé zbarvení. Ke zdárnému zahájení hojivého procesu, by měla být nekrotická tkáň ve většině případů odstraněna (Stryja, 2010).

#### **2.5.2.6 Přetrvávající přítomnost mikroorganismů a infekce**

Nehojící se rány jsou běžně kolonizovány bakteriemi z okolního prostředí, které mohou být jak striktní patogeny, tak i podmíněné patogeny a mikroorganismy normálně žijící na tělesném povrchu. Vznik infekce se odvíjí od množství bakterií na spodině rány, jejich faktorů virulence, toxinů, které produkují do okolí, a také od imunitní odpovědi pacienta (Stryja, 2010).

Infekce nemusí mít typické projevy a její jedinou vizuální známkou může být pouze nehojící se ulcerace. Proces hojení stagnuje v zánětlivé fázi. Účinkem bakteriálních proteáz se rozrušují nově vytvořené granulační tkáň, kolagen a růstové faktory. Navíc zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů na spodině rány znemožňují započnutí proliferační fáze.

Infekce může mít za následek sepsi organismu (Stryja, 2010).

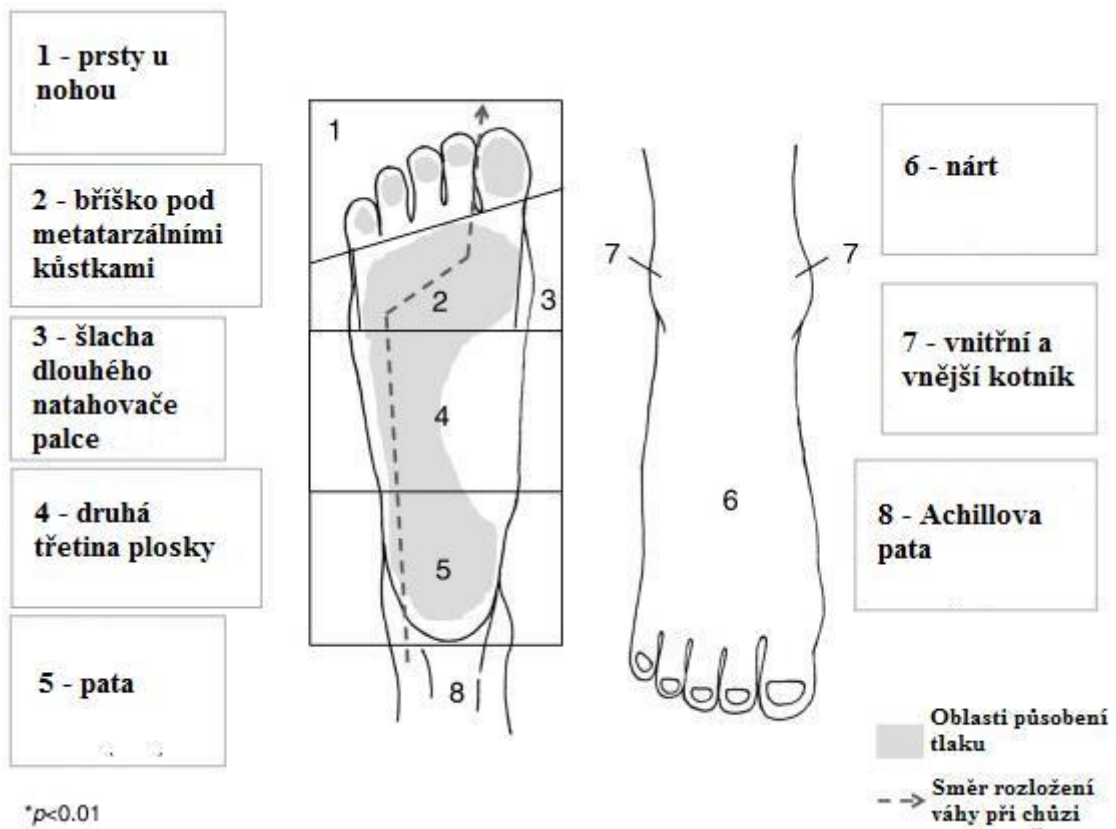
Po chirurgických zákrocích navíc k rozvoji infekce přispívá uzavřený prostor, ischemie, nedostatečné zásobení okrajů ran kyslíkem, acidóza, či přítomnost cizího tělesa v organismu (infekce *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*) (Grey *et al.*, 2006).

#### **2.5.2.7 Tlak a teplota**

Pro optimální hojení je ideální běžná tělesná teplota, odchylky od této teploty jsou nežádoucí. Pouhé snížení teploty o 2 °C již zpomaluje hojení.

V případě nepřiměřeného nebo trvalého tlaku v místě rány může dojít k narušení krevního zásobení kapilárních sítí, a to pak následně brání toku krve do okolní tkáně, což opět prodlužuje rekonvalescenci. Na obrázku 1 je zakresleno osm lokalit, kde je působení tlaku nejvyšší. V těchto místech se nejčastěji nalézají ulcerace. Bylo zjištěno, že u 84,1 % pacientů s neuropatickými vředy se vyvinuly ulcerace v oblastech s vysokým tlakem (špička,

metatarsální hlava, plantární medialita a pata). Dorsální, malleolová a Achilova šlacha byly dalšími místy pro tvorbu neuropatických vředů. Více než 70 % pacientů s ischemickými a neuro-ischemickými ranami mělo zasaženo prsty u nohou (Yotsu *et al.*, 2014).



**Obrázek 1** Lokalizace ulcerací na místech s velkým tlakem. (Yotsu *et al.*, 2014).

### 3 Biofilm

Bakterie jsou schopné existence ve dvou oddělených životních formách, a to planktonní, ve které žijí volně coby samostatné buňky ve velkém objemu, anebo přisedlé, které žijí ve společenství jako jeden organismus spojený s povrchem, v němž jsou buňky vázány v extracelulární matici. Tato přisedlá společenstva jsou známá jako biofilmy.

Bakteriální biofilmy jsou strukturovaná společenstva buněk uzavřených ve vlastní produkované hydratované polymerní matici, adherující k inertnímu nebo živému povrchu. Tvorba biofilmů způsobuje jejich inherentní odolnost vůči antibiotikům a hostitelské imunitní obraně jsou kořeny mnoha perzistujících a chronických bakteriálních infekcí.

Biofilmy poskytují mikroorganismům zvýšenou odolnost proti fyzikálním a chemickým stresům a představují preferovaný způsob života.

První studie biofilmů se datují od počátků 80. let. Byly však omezeny na mikroskopické techniky a nedosahovaly tak potřebných kvalit. V dnešní době se již například používá konfokální skenovací laserová mikroskopie, což umožnilo pozorování plně hydratovaných, živých biofilmů, které přispěly k běžné teorii o tom, co tvoří strukturu biofilmu, zejména při jeho zralosti (Moreira, 2010).

Pro svou schopnost tvorby biofilmu byly intenzivně studovány bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Tento kmen byl vybrán jako model tvorby biofilmu (Whitchurch *et al.*, 2002).

Biofilm kolonizuje v tenké vrstvě různé povrchy, v tomto případě především povrch akutních a chronických (nehojících se) ran. Bakterie žijící v těchto strukturovaných společenstvech se pak fyziologicky (především v genetické výbavě) i morfologicky liší od volně žijících bakterií stejného druhu a zastávají v biofilmu různé funkce (Brandenburg *et al.*, 2015).

Biofilm se vyskytuje až u 60 % nehojících se ran, kdy se na spodině rány často jeví jako transparentní povlak, jež se opět rychle obnovuje po mechanickém odstranění (Brandenburg *et al.*, 2015).

Tato společenství významně zpomalují normální hojení tím, že slouží jako rezervoár bakteriálních buněk, které odolávají jak antibiotické léčbě, tak i zásahu imunitního systému, a to především tím, že vytvářejí hypoxemické mikroprostředí a produkují na povrch biofilmu mukopolysacharidové matrice adherující k povrchu, specifické toxiny, algináty, exopolysacharidy a nemnožící se bakterie. Díky tomu nemají bakteriostatická antibiotika

žádný účinek a protilátky imunitního systému a fagocytóza nemají dostatečný efekt (Brandenburg *et al.*, 2015).

Patogenní bakterie, které jsou schopné tvořit biofilm, jsou příčinou mnoha opakujících se infekcí jako jsou parodontitidy (zánětlivé onemocnění závěsného aparátu zubů, známé jako parodontóza, paradentóza, či paradontóza), endokarditidy, chronické ušní záněty, cystické fibrózy, močové ústrojí a záněty ran. V mnoha případech se stává, že při zavádění nitrožilních katetrů, umělých kloubů a kardiostimulátorů, na kterých velmi často ulpívají lidské sérové proteiny a extracelulární matrix, dojde na jejich povrchu k vytvoření biofilmu (Wasfi *et al.*, 2012).

Takové bakteriální břemeno může vyvolat chronický zánětlivý stav a tím narušit proces regenerace. U takových ran se velmi pravděpodobně zvýší raná sekrece a rozvine charakteristický zápach. Bakteriální biofilm, zůstávající v ráně, může odolat procesu očištění a slouží jako rezistentní zásobník mikrobiálních buněk, což vede k dalším prodlevám při hojení. V současnosti jsou vyhledávány nové léčebné postupy, které odstraňují biofilm nebo zabraňují jeho tvorbě, pro zlepšení péče o chronické nehojící se kožní rány. Standardní antibiotická léčba je totiž schopná pouze eliminovat planktonní a povrchové bakterie biofilmu a zanechává vestavěné (přetrvávající) buňky, které se ihned po odeznění účinků léčby začnou množit a obnoví svou populaci (Wasfi *et al.*, 2012).

Obvazy na rány mohou poskytnout další plochu pro připojení bakteriálních buněk a tvorbu biofilmu v nehojících se ranách. Různé zprávy metodou skenovací elektronové mikroskopie dokumentují přítomnost bakteriálních biofilmů na obvazech ran a na řadě lékařských implantátů, a to včetně chirurgických stehů. Vůbec poprvé byl biofilm prokázán na povrchu kožních svorek a stehů. Kontaminace obvazů na rány vyžaduje jejich odstranění a vede k následnému čištění zranění, zvyšuje nepohodlí pacienta a dále zpomaluje proces hojení (Wasfi *et al.*, 2012).

### **3.1 Tvorba biofilmu**

Biofilmy rostou pomaleji než planktonní formy. Je tomu tak nejspíše z důvodu, že buňky jsou omezeny nutričním, či kyslíkovým nedostatkem.

Biofilm vzniká nevratným přichycením mikrobiálních buněk k povrchu nebo k okolním buňkám. Jedná se o usazení v polymerní mimobuněčné hmotě, kterou samy buňky produkovaly. Tyto buňky musí mít změněné růstové vlastnosti (Donlan, 2002).

Pomocí adhezínů se plovoucí planktonní buňky přichycují na pevný povrch. Po změně svého fenotypu začnou produkovat velké množství lepkavého polysacharidu. Vzniká



hydrogelová matrice, která udržuje buňky pohromadě. Buňky totiž zahájí buněčné dělení, tvoří mikrokolonie a produkují extracelulární polymery, které definují biofilm. Tyto extracelulární polymerní látky (EPS) se skládají především z polysacharidů a lze je detekovat jak mikroskopicky, tak i chemicky. EPS poskytují matici, čili strukturu pro biofilm. Jsou vysoce hydratované (98 % vody) a pevně spojené s podkladovým povrchem (Donlan, 2001).

Rychlost uchycení je ovlivněna například přítomností flagell, pilů, fimbrií nebo glykokalyxem. Jakmile se totiž mikrobiální buňka ocitne na povrchu, musí překonat odpudivé síly a tyto přichycovací součásti buňky umožňují, aby buňka zůstala připojena, dokud nebudou zavedeny další trvalé připevňovací mechanismy (Donlan, 2001).

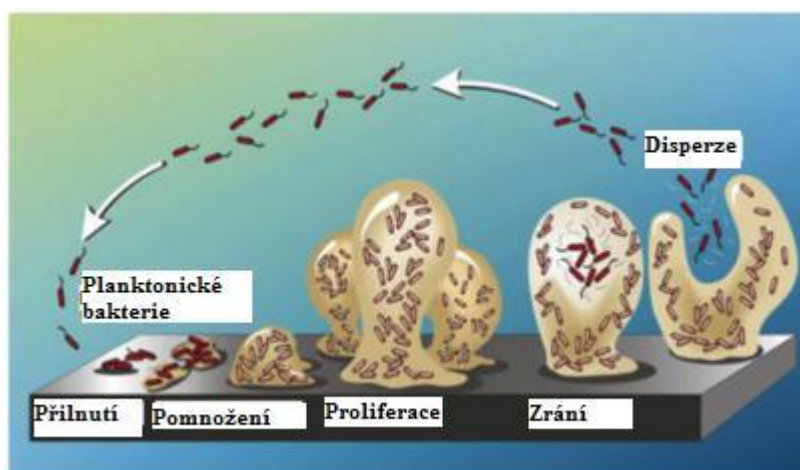
V extracelulární polymerní matici se buňky mohou množit a vytvářet mikrokolinie. Z biofilmu se buňky mohou pomocí impulzu odpojit do jednotlivých planktonních buněk. Následně migrují a mohou kolonizovat další místa povrchu. Jedná se o heterogenní kus hmoty s kolísající tloušťkou od několika  $\mu\text{m}$  až do stovek  $\mu\text{m}$ . Skládá se z různých shluků, mnoha dutin a propojených kanálků, kde buňky rostou v mikrokoloniích (Donlan, 2001).

Studie ukazují, že až 80 % bakterií, které kolonizují chronické rány, jsou schopny tvořit biofilm.

Nejsilnější biofilmy utváří rody *Klebsilla*, *Proteus*, *Pseudomonas* a *Staphylococcus*. Bylo zjištěno, že některé bakterie jako *Staphylococcus aureus*, koaguláza negativní stafylokoky a enterobaktery izolované z infikovaných ran, vykazují mnohem silnější schopnost tvořit biofilm, než bakterie stejného druhu, které tvoří biofilm v močových cestách (Wasfi, 2012); (Enea Gino *et al.*, 2017).

### 3.1.1 Fáze tvorby biofilmu

Vývoj biofilmu se skládá ze tří fází. První fází zahrnuje přilnutí. Planktonní buňky adherují k povrchu a prolifерují do lepivých shluků. Následuje kumulace a zrání. Agregáty bakterií vzniklé v této fázi se nazývají mikrokolonie. Dále pak začnou bakterie produkovat ECM (extracelulární matrix), což esenciálně slouží jako základ pro založení trojrozměrné struktury. Poslední fází je oddělení a rozptýlení bakterií. Po dosažení specifické hustoty buněk je spuštěna ECM degradace a buňky jsou uvolněny a rozptýleny a znovu se spouští celý mechanismus (Moormeier a Bayles, 2017).



**Obrázek 2:** 5 fází životního cyklu biofilmu - 1. Přilnutí, 2. Pomnožení, 3. Proliferace, 4. Zrání, 5. Odlučování bakterií a šíření kolonie. (Gajdošová *et al.*, 2015).

### 3.2 Struktura biofilmu

Struktura biofilmu je dynamická a viskózně elastická (tvar houby). Tvorbou biofilmu zastoupené bakterie zvyšují vlastní virulenci, podílí se totiž na toleranci i vzniku rezistence přítomných mikroorganismů (Percival a Cutting, 2004).

Biofilmy se skládají především z mikrobiálních buněk a EPS (extracelulární polymerní substance). EPS může být považováno za primární matricový materiál biofilmu. EPS se může lišit v chemických a fyzikálních vlastnostech, ale je složen především z polysacharidů. Některé z těchto polysacharidů jsou neutrální nebo polyanionové, stejně jako EPS u gramnegativních bakterií. Biofilmy se skládají především z EPS mikrobiálních buněk. Přítomnost uronových kyselin nebo ketal-vázané pyruváty poskytuje aniontovou vlastnost. Tato vlastnost je důležitá, protože umožňuje sdružování dvojmocných kationtů, jako je vápník a hořčík, u nichž bylo prokázáno, že se zesilují s polymerními svazky vláken a poskytují větší vazebnou sílu ve vyvinutém biofilmu. V případě některých grampozitivních bakterií, jako je *Staphylococcus*, může být chemické složení EPS zcela odlišné a může být primárně kationtové. Hydrogel koaguláza negativních bakterií se skládá z kyseliny teichoové a malého množství bílkovin. EPS je také vysoce hydratovaný, protože může do své struktury absorbovat velké množství vody díky vodíkovým vazbám. EPS může být pouze hydrofobní, i když je většina typů zároveň hydrofilní i hydrofobní (Donlan, 2002).

Každá mikrobiální biofilmová struktura je jedinečná, ačkoliv některé strukturální atributy lze obecně považovat za univerzální. Termín biofilm je v některých ohledech nesprávným pojmenováním, protože biofilmy nejsou trvalou monovrstevnou povrchovou vrstvou. Biofilmy jsou spíše heterogenní a obsahují mikrokolonie bakteriálních buněk

uzavřených v matici EPS a jsou odděleny od jiných mikrokoloníí intersticiálními dutinami (vodními kanálky) (Donlan, 2002).

### 3.2.1 Interakce částic

Struktura může být ovlivněna také interakcemi složek z hostitele nebo prostředí. Například erythrocyty a fibrin se mohou akumulovat ve formě biofilmu. Biofilmy na nativních srdečních chlopních poskytují jasný příklad tohoto typu interakce, při kterém se bakteriální mikrokolonie biofilmu vyvíjejí v matici destiček, fibrinu a EPS. Fibrinová kapsle, která se vyvíjí, ochrání organismy v těchto biofilmech před leukocyty hostitele, což vede k infekční endokarditidě. Biofilmy na močových katetrech mohou obsahovat organismy, které mají schopnost hydrolyzovat, působením ureázy, močovinu v moči za vzniku volného amoniaku (Donlan, 2002).

### 3.3 Techniky odstraňování biofilmu z chronických ran

Inhibice tvorby biofilmů a jejich odstraňování nejsou jednoduché. V každém jednotlivém případě záleží na druhu bakterií, jež ránu kolonizují. Například častým mikroblem kolonizujícím nehojící se rány je *Pseudomonas aeruginosa*. U tohoto druhu bylo zjištěno, že tvorbu jejího biofilmu in vivo značně narušuje tryptofan, a to pokusem, při němž byly obvazy na rány inkubovány v suspenzích *P. aeruginosa* po dobu 48 hodin při 30 °C, třikrát promyty fosfátovým pufrům pro odstranění planktonní buněk a byly aplikovány na kožní rány na hřbetu myši. U dalších dvou skupin testovaných subjektů se stejnými ranami, byla zranění překryta obvazy bez bakteriálních buněk (kontrola) a s biofilmem *P. aeruginosa* inhibovaným tryptofanem. U myši, které byly obvázány posledním typem, se biofilm nevytvořil (Brandenburg *et al.*, 2015).

Inhibice růstu bakteriálního biofilmu pomocí D-aminokyselin byla poprvé popsána u gram pozitivních druhů *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*. Zjistilo se, že aminokyselina tryptofan inhibuje tvorbu biofilmu gramnegativními patogeny, jako *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Tryptofan inhibuje tvorbu biofilmu a dokonce disperguje již vytvořené biofilmy po 24 hodinách. Ačkoliv mechanismus účinku není doposud plně objasněn, je jisté, že má tryptofan příznivý účinek na proces hojení a uzavření rány (Brandenburg *et al.*, 2015).

*Proteus mirabilis* se podílí na tvorbě nejsilnějších biofilmů. Vyzkoušením efektu různých antimikrobiálních látek (amoxicillin, ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, erythromycin, gentamicin nitrofurantoin, ceftriaxone, chloramphenicol) na planktonní buňky,

bakterie syntetizující biofilm a již vytvořený biofilm destičkovou metodou, bylo prokázáno, že proti němu použitý ciprofloxacin, byl neefektivnější v inhibici tvorby biofilmu, a společně s ceftriaxonem byl účinný v částečném odstranění biofilmu (Wasfi *et al*, 2012).

### **3.3.1 Debridement**

Velmi důležitou součástí procesu hojení rány je autolytický debridement. Debridement je odstranění nežádoucích elementů z rány, jako je nekrotická tkáň, cizí tělesa, bakterie a biofilm samotný. Bylo prokázáno, že debridement urychluje hojení ran.

Po zhodnocení rizikových faktorů, které mohou ovlivnit regenerační proces, se zvolí vhodná metoda debridementu. Takových metod existuje mnoho a je možné je provést pouze jednorázově, opakovaně nebo kontinuálně v průběhu několika týdnů. Jako nejdůležitější metody lze uvést autolytický, larvový, mechanický, ostrý, chirurgický nebo hydrochirurgický debridement (Atkin, 2014).

#### **3.3.1.1 Autolytický debridement**

Nejběžnější metodou je autolytický debridement, který je běžnou součástí procesu hojení a probíhá v zánětlivé fázi. Je pouze nutné zajistit vhodnou vlhkost rány. Přebytečná vlhkost se ze zranění odvádí suchými obvazy, nebo v opačném případě se rány zvlhčují pomocí speciálních obvazových materiálů. Tyto úkony jsou v praxi prováděny zdravotními sestrami.

Autolytický debridement je bezbolestný, neinvazivní a snadno proveditelný. Doba trvání tohoto procesu však může být dlouhá, a tím se zvyšuje riziko infekce a macerace (Atkin, 2014).

#### **3.3.1.2 Debridement s využitím larev**

Larvy biologicky odstraňují odumřelé buňky z poranění, konzumují bakterie v ráně a stimulují proces hojení tím, že svojí činností podporují růst fibroblastů. Léčba pomocí larev je rychlá, ale nákladnější, navíc nebývá snadno přijímána některými pacienty (Atkin, 2014).

#### **3.3.1.3 Mechanický debridement**

Mechanické odstraňování odumřelé tkáně je oproti ostatním metodám nejrychlejší. Bývá však bolestivé a nepohodlné, proto se v poslední době čím dál častěji využívají debridementové podložky (Debrisoft). Debrisoft jsou jednorázové, měkké, polyesterové a vláknité podložky, jež se zlehka pokládají na ránu. Exsudát a mrtvé buňky se odstraní z rány

a zůstanou v monofilních vláknech podložky. Je to velmi šetrná metoda a není nutno před jejím provedením podávat analgetika (Atkin, 2014).

#### **3.3.1.4 Ostrý debridement**

V tomto případě je mrtvá tkáň odstraněna lékařským pracovníkem, který pomocí skalpelu vyřízne nekrotické části (Atkin, 2014).

#### **3.3.1.5 Chirurgický debridement**

Tento typ debridementu se provádí na operačním sále chirurgem. Jeho výsledky jsou okamžité, ale je nutno podávat nemocnému analgetika před i po provedení zákroku. Od tohoto faktu se také následně odvíjejí náklady na léčbu (Atkin, 2014).

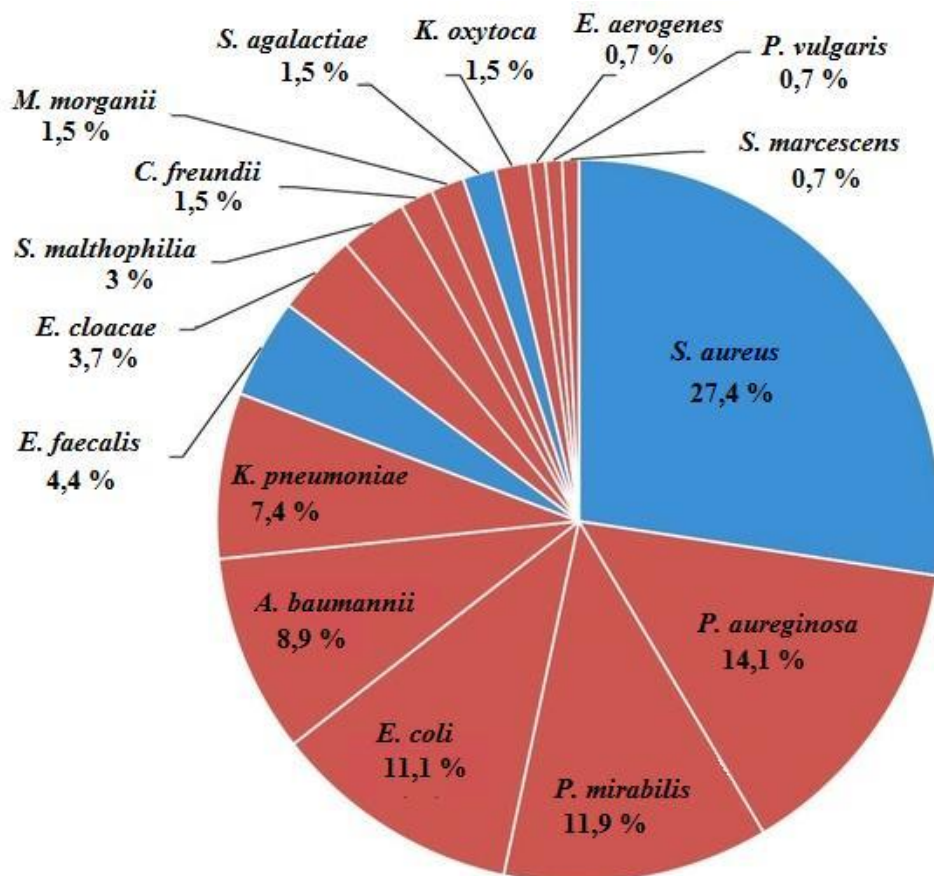
#### **3.3.1.6 Hydrochirurgický debridement**

Hydrochirurgie využívá jako nástroj pro odstranění nežádoucí tkáně tlak proudu vody, či solného roztoku. Je to rychlá metoda, ale může být bolestivá a není vhodná pro všechny pacienty (Atkin, 2014).

## 4 Nejčastěji nalézané mikroorganismy v chronických ranách

Typ a relativní počet přítomných bakterií je závislý na druhu rány a jiných faktorech. Podle článku od doktora Amina Omara se v ráně průměrně vyskytuje až 17 druhů bakterií (Omar *et al.*, 2017).

Enea Gino zjistil ve své studii, že 60,8 % ze 135 izolovaných druhů bakterií od 87 pacientů s chronickými ulceracemi (56,3 % venózní ulcerace, 5,8 % arteriální ulcerace, 18 % neuropatické ulcerace, 25,2 % dekubity) bylo gramnegativních. Přičemž z nich bylo 31,8 % multirezistentních k antimikrobiálním látkám (MDRO). Dále uvádí, že 80 % všech vyizolovaných kmenů bylo schopno tvořit biofilm a MDRO produkovaly biofilm ve stejné míře jako non-MDRO. Jako zástupci mikroorganismů tvořících biofilm byly uvedeny bakterie *Acinetobacter baumannii* a ESBL kmeny (produkující širokospektré  $\beta$ -laktamázy) jako *Klebsiella pneumoniae* či *E. coli* (Enea Gino *et al.*, 2017).



**Graf 1** Izolované druhy bakterií od pacientů s chronickými ulceracemi. (Modře jsou vyznačeny grampozitivní kmeny a červeně gramnegativní. Nalezené druhy byly

*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris* a *Serratia marcescens*) (Enea Gino *et al.*, 2017).

Nejčastějším druhem z gramnegativních bakterií byly multirezistentní kmeny *Pseudomonas aeruginosa* (MDRPA), jejichž výskyt byl 14,1 %. A dalším důležitým faktem bylo, že všechny zachycené kmeny *Staphylococcus aureus* byly rezistentní na methicilin (MRSA) (Enea Gino *et al.*, 2017).

## 4.1 GRAMPOZITIVNÍ MIKROORGANISMY

### 4.1.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* se řadí mezi grampozitivní koky velikosti asi 1  $\mu\text{m}$ , jež se mohou vyskytovat v nepravidelných shlucích tvaru typických hroznů. Není pohyblivý, ale některé kmeny mohou tvořit pouzdra. Celý rod stafylokoků také patří mezi fakultativně anaerobní bakterie, jak s respiračním, tak i fermentačním metabolismem. Z hlediska patogenity se dělí stafylokoky dle schopnosti tvořit plasmakoagulázu. Rod *Staphylococcus* se dělí na koaguláza negativní a pozitivní, do nichž se řadí *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus intermedius* (Bednář 1994).

Existují 2 poddruhy kmene *Staphylococcus aureus* a to *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* a *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*. *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* roste v anaerobním prostředí a v lidském organismu se nenalézá. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (dále už jen *Staphylococcus aureus*) se vyskytuje přibližně u třetiny lidí jako komenzál na kůži nebo na sliznicích a nevyvolává žádné obtíže. Pokud, ale dojde k poruše přirozené odolnosti, projeví se jako patogen (Votava, 2003).

*Staphylococcus aureus* je velmi dobře adaptován na život v lidském organismu. Ve své buněčné stěně má velké množství biologicky aktivních látek a soubor antigenů, působící jako faktory virulence. K jeho buněčným antigenům patří pouzdro (polysacharid obklopující buňku jako glykokalix), stafylokokový peptidoglykan (účinkuje podobně jako endotoxin, uvolňuje cytokiny z makrofágů aktivací komplementu a shlukováním krevních destiček), kyselina teichoová, neboli skupinově specifický polysacharid A (hlavní antigenní determinanta všech kmenů *S. aureus*, napomáhá adhezi na sliznice a rány, kde se kyselina teichoová váže na fibronektin), stafylokokový protein A (hlavní bílkovinná součást buněčné

stěny, společný skupinový antigen většiny kmenů, jeho reakce s Fc-fragmentem imunoglobulinů chrání před opsonizací protilátkami), vázaná koaguláza (shlukovací faktor, konvertuje fibrinogen na fibrin, což shlukuje bakterie suspendované v plazmě), adhesiny (adheze bakterií k bílkovinám mezibuněčné hmoty – fibronectin, vitronektin, laminin, kolagen), extracelulární bílkoviny, koaguláza (produkována do okolí, přispívá k opouzdření), stafylokináza (působí fibrinolyticky vyvoláním konverze plasminogenu na plasmin), termostabilní nukleáza (typická pro *S. aureus*, působí jako endonukleáza i exonukleáza), hyaluronidáza (zvyšuje invazivitu), leukocidin (cytotoxický toxin působící na polymorfonukleáry a makrofágy), epidermolytický toxin exfolafin, enterotoxiny (indukce tvorby IL-1, aktivace T-lymfocytů, zvyšují toxicitu gramnegativních bakterií, několik antigenních typů – A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D a E), další enzymy ( $\beta$ -laktamáza) a hemolyziny. Většina kmenů *S. aureus* produkuje jeden či více těchto cytotoxinů, liší se specifitou pro erythrocyty různých živočišných druhů. Nazývají se:  $\alpha$ -hemolyzin (hlavní toxin lidských kmenů, poškozují membrány buněk),  $\beta$ -hemolyzin (sfingomyelináza C),  $\gamma$ -hemolyzin (2 bazické proteiny) a  $\delta$ -hemolyzin (vytvářen většinou lidských kmenů, povrchově aktivní látka) (Bednář 1994).

Kolonie *Staphylococcus aureus* jsou většinou na kultivačních médiích barevné, mohou mít smetanovou, žlutou či oranžovou barvu, díky karotenovým pigmentům. Na krevním agaru vytváří typickou zónu hemolýzy. Laboratorně kultivované kmeny jsou většinou neopouzdřené, naproti tomu až 60 % kmenů izolovaných ze živého organismu má pouzdro (Votava, 2003).

#### **4.1.1.1 Výskyt *Staphylococcus aureus* v nehojících se ranách**

*Staphylococcus aureus* nalezneme nejčastěji v biofilmu na kloubních náhradách a protézách nebo při zavedení močových a nitrožilních katetrů.

Látky zabraňující stafylokokům v tvorbě biofilmů více než ze 70 % jsou myricitrin, hesperetin a florentin (Lopes *et al*, 2017).

Chitosan je přírodní látka, která se prokázala jako účinná proti planktonním buňkám i buňkám *Staphylococcus aureus* v biofilmu, jež jsou methicillin rezistentní (MRSA) (Costa *et al*, 2017).

Chronický biofilm vytvořený infekcemi *S. aureus*, zpravidla vede k významnému zvýšení morbidity a mortality, zvláště pokud se usídí na zdravotnickém příslušenství. *Staphylococcus aureus* tvoří biofilmy obdobným způsobem jako ostatní bakteriální druhy. Mnoho studií ukázalo, že dozrává v tenkých vrstvách buněk a bodově jsou spouštěny



mechanismy zapřičiňující oddělení bakteriálních buněk. Tím pádem jsou subpopulace rozptýleny, mikrokolonie se odštěpují a zůstává biomasa. Ukázalo se, že tento proces má 5 fází. Nejprve dojde k přilnutí planktonních buněk *S. aureus*, následně se buňky pomnoží, poté dochází k exodu a zraní biofilmu, v konečné fázi mikroorganismus disperguje (Moormeier a Bayles, 2017).

#### 4.1.2 Koaguláza negativní stafylokoky v chronických ranách

V minulosti byly tyto stafylokoky označovány souhrnným názvem *Staphylococcus albus*, na základě zbarvení kolonií. Byly pokládány za nepatogenní bakterie, které se běžně vyskytují v normální mikroflóře lidí a zvířat. Řadí se sem asi 20 druhů, z nichž některé nalezneme pouze u zvířat (Bednář, 1994).

Koaguláza negativní stafylokoky (CoNS) neprodukuje enzym koagulázu, na rozdíl od nejznámějšího kmene *Staphylococcus aureus*. Jejich nejznámějšími zástupci, kteří kolonizují nehojící se rány, jsou *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. saccharolyticus*, *S. auricularis*, *S. caprae*, *S. lugdunensis* a *S. schleiferi* subsps. *Schleiferi* (Cunha a Calsolari, 2008).

Incidence infekcí způsobených CoNS se v posledních letech neustále zvyšuje, ikdyž ve většině případů je infekce způsobena bakteriemi *S. aureus* (Yazgi a Uyanik, 2010).

Bakterie *Staphylococcus haemolyticus* a *Staphylococcus lugdunensis* bývají často nalézány na zdravotnických implantátech, které byly vpraveny do organismu, a způsobují komplikace pooperačního hojení. Obecně kolonizují i nehojící se rány s různými příčinami vzniku (Yazgi a Uyanik, 2010).

Koaguláza negativní stafylokoky kolonizují nejen zdravotnické nástroje a příslušenství, ale byly vyizolovány i z chronických venózních ulcerací, kdy z nich bylo 47 % rezistentní na meticilin (MRCoNS) (Martins *et al.*, 2012).

CoNS způsobují nozokomiální infekce, sepse, endokarditidy, meningitidy, infekce močových cest a operačních ran, a produkují řadu enzymů a toxinů (Bednář, 1994).

Jako u mnoha patogenních i podmíněně patogenních bakterií, se i u koaguláza negativních stafylokoků stále více setkáváme s jejich vzrůstající rezistencí vůči antibiotickým látkám. Bylo prokázáno, že i v tomto případě, je velmi účinnou látkou med, který pomáhá ničit jak planktonní buňky, tak i bakterie vázané v biofilmové matici (French *et al.*, 2005).

### 4.1.3 *Streptococcus pyogenes*

*Streptococcus pyogenes* patří do skupiny grampozitivních a  $\beta$ -hemolytických (pyogenních) streptokoků. Pod mikroskopem jej lze spatřit jako kulaté až lehce ovoidní koky o velikosti 0,6 až 1  $\mu\text{m}$ , uspořádané do dvojic nebo řetízků. Některé kmeny mívají hyaluronové pouzdro. Je fakultativně anaerobní, netvoří katalázu ani oxidázu a hlavním produktem jeho metabolismu je kyselina mléčná. Tento mikroorganismus obsahuje skupinově specifický polysacharid C, díky němuž lze přiřadit dle Lancefieldové *S. pyogenes* antigenní skupinu A (Bednář, 1994).

Dále také má M-protein (vláknitá struktura vyčnívající ze stěny, váže se na něj regulační faktor komplementu H a fibrinogen), peptidoglykan (rigidita stěny), bílkovinné antigen R a T a kyselina lipoteichoová (adhereční vlastnosti). Z extracelulárních faktorů virulence jsou nejvýznamnější hemolyziny, streptolysin O (toxický pro leukocyty a monocyty), streptolysin S (zahubení leukocytů, které fagocytovaly pyogenní streptokoky) a jako další faktory virulence nutno uvést streptokinázu a enolázu, (vážou tkáňový plasminogen), hyaluronidázu (usnadňuje průnik streptokoků do tkání, rozpouští mezibuněčné tmely a pojivo), deoxyribonukleázu B, enzym C5a-peptidázu (štěpí komplementový fragment C5a, inhibuje chemotaxi leukocytů) a pyogenní toxiny (Votava, 2003).

Tento druh je poměrně kultivačně náročný, pro záchyt se běžně užívá krevní agar s 5 % beraní krve. Kolonie jsou drobné (cca 1 – 2 mm) a obklopené zónou úplné hemolýzy (Bednář, 1994).

Bakterie *S. pyogenes* především iniciují vznik erysipelu v podkoží, který zpravidla recidivuje (Rozehnalová *et al.*, 2008).

Pyogenní infekce často způsobují i vertebrální osteomyelitidy po chirurgických zákrocích. Je tomu tak pravděpodobně díky vytvoření biofilmu na voperovaných implantátech. V takovém případě bývá léčba velmi náročná, dochází ke stagnaci hojení těchto ran a implantáty jsou vyjmuty (Wei-hua *et al.*, 2007).

Biofilmy *Streptococcus pyogenes* vykazují výraznou odolnost vůči antimikrobiálním látkám. Bylo vyzkoumáno, že esenciální oleje rostlin jako *Mentha piperita* (máta peprná) a *Rosmarinus officinalis* (rozmarýn lékařský), extrakty z thajských rostlin, a především mořské aktinomycety mají výrazný vliv na redukci a inhibici těchto streptokokových společenstev se sérotypem M (Nithyanand *et al.*, 2010).

Další významnou látkou, jež způsobuje buněčnou smrt bakterií v biofilmech *S. pyogenes* je med manuka. Inhibuje bakteriální adhezi k fibronektinu, fibrinogenu, kolagenu a lidským keratinocytům (Maddocks *et al.*, 2013).

#### **4.1.4 *Enterococcus sp.***

Enterokoky jsou součástí přirozené mikroflóry ve střevě. Pod mikroskopem mohou být pozorovány jako grampozitivní koky spojené ve dvojicích, či řetězcích. Vyznačují se odolností k vysokému pH (až 8,5) i teplotám, jsou také vysoce rezistentní na antibiotika. Enterokoky jsou kultivačně nenáročné, na krevním agaru rostou v šedavých koloniích s možnou  $\alpha$ ,  $\beta$  nebo  $\gamma$ -hemolýzou, zatím co na Slanetz-Bartleyově agaru vytváří fialově hnědé kolonie. Prokazují se ze vzorků moči, hemokultur nebo gynekologických výtěrů.

Enterokoky patří mezi podmíněné patogeny. Způsobují infekce močových a žlučových cest, gynekologické záněty a pooperační komplikace u operací dutiny břišní, dále se podílí i na vzniku infekční endokarditidy (Votava, 2003).

Druhy grampozitivních bakterií rodu *Enterococcus* jsou velmi produktivní, co se biofilmů týče, zejména pak zástupci druhu *Enterococcus faecalis*. Mezi jejich hlavní faktory virulence při infekci ran patří produkce gelatináz, deoxyribonukleáz a kaseináz. Produkují také adheziny, jež se nejvíce uplatňují v tvorbě jejich vlastních biofilmů (Biswas *et al.*, 2014).

Bylo zjištěno, že většina z klinických VRE (vankomycin rezistentní enterobaktery) je multirezistentní a u 27 % kmenů VRE byla pozorována tvorba hydrogelových obalů (Biswas *et al.*, 2014).

Výskyt biofilmu, tvořených enterokoky, byl prokázán na katetrech zavedených do organismu, v neuropatických ulceracích a abcesech (Rhoads *et al.*, 2012); (Biswas *et al.*, 2014).

## **4.2 GRAMNEGATIVNÍ MIKROORGANISMY**

### **4.2.1 *Escherichia coli***

Tato známá bakterie se nachází v trávicím traktu člověka a je důležitým modelovým organismem mikrobiologie. Je to gramnegativní, nesporulující, pohyblivá tyčinka pozitivní na katalázu a negativní na oxidázu. Štěpí glukózu a laktózu za tvorby plynu, produkuje indol, ale neštěpí močovinu. Antigenní struktura *E. coli* je popsána podle antigenů O, H, K. Tento mikrob je podmíněně patogenní a dle její patogenity ve střevě rozlišujeme kmeny EPEC (enteropatogenní – novorozenecké průjmy, antigenní typy O55, O111, O126, O86), EAEC (enteroadherentní), ETEC (enterotoxigenní – 2 typy enterotoxinů: tepelně stabilní a tepelně

nestabilní), EIEC (enteroinvazivní – krvavé průjmy), STEC (schiga-like toxin, hemolyticko-uremický syndrom, nejběžnější sérotyp O157:H7), EAaggEC (enteroagregativní), DEAC (difusně adherentní) a UPEC (uropatogenní) (Votava, 2003).

*E. coli* se velmi dobře kultivuje na široké škále půd a při ideálních podmínkách je její generační doba 20 minut (Votava, 2003).

*Escherichia coli* vytváří v chronických ranách vícekmennové biofilmy s dalšími druhy patogenních a podmíněně patogenních druhů. Biofilmy samotné *E. coli* nebyly v nehojících se ranách popsány (Vacheva *et al.*, 2012).

*E. coli* byla popsána v dekubitech ve společenství s druhem *Pseudomonas aeruginosa*, v biofilmech pokrývajících žilní katetry, kde se vyskytovala v koexistenci s bakteriemi *Enterococcus faecalis*, a ve společenstvích osidlující diabetické ulcerace (Donelli a Vuotto, 2014); (Abbas *et al.*, 2014).

Ze studie, která zkoumala tvorbu biofilmu *Escherichia coli* v závislosti na kyslíku vyplývá, že v aerobním prostředí dominuje biofilm s vysokým množstvím mikrokolonií ve tvaru hub s póry a kanálky, zatímco v anaerobním prostředí byl biofilm tenčí a méně heterogenní, a tím pádem bylo společenstvo méně vzrostlé (Bjergbaek, *et al.*, 2006).

#### **4.2.2 *Klebsiella pneumoniae***

Tento kmen byl izolován v 1882 C. Friedlandrem. *Klebsiella pneumoniae* je gramnegativní, nepohyblivá, zapouzdřená, laktózu fermentující, neprodukující indol, fakultativně anaerobní tyčka, tvořící součást běžné flóry v ústech, trávicím traktu a na kůži. Je klinicky nejvýznamnějším členem rodu *Klebsiella* z čeledi *Enterobacteriaceae* (Votava, 2003).

Infekce bakteriemi *Klebsiella pneumoniae* se vyskytují převážně u jedinců s oslabeným imunitním systémem, špatným nutričním stavem a životním stylem (alkoholiků a diabetiků). Velmi často dojde ke vzniku nozokomiální infekce, kdy se oslabený pacient nakazí při pobytu v hospitalizačním zařízení. Nejčastějším infekčním onemocněním, jež rod *Klebsiella* způsobuje je pneumonie. Klebsiely jsou také druhým nejčastějším (po *E. coli*) původcem infekce močových cest u starších lidí. Pro pacienty s chronickým onemocněním plic, střevním onemocněním, atrofií sliznice nosní a rhinoskleromem může tato bakterie být oportunním patogenem. Hlavním zdrojem infekce je stolice, dalším pak kontakt s kontaminovanými nástroji (Rashid, 2007).

V současnosti přibývá stále více resistantních kmenů, ale zatím by většina *Klebsiella pneumoniae* měla být citlivá ke gentamycinu a cefalosporinům (Rashid, 2007).

Výzkum prováděný na King's College v Londýně prokazuje, že molekulární rozdíly mezi HLA-B27 (antigen) a dvěma extracelulárními molekulami tohoto mikroorganismu podmiňují vznik ankylozující spondylitidy (Rashid, 2007).

*Klebsiella pneumoniae* patří mezi nejsilnější producenty biofilmů, osidluje urinární i nitrožilní katetry a byla nalezena i v diabetických ulceracích a dekubitech (Enea Gino *et al.*, 2017); (Donelli a Vuotto, 2014); (Abbas *et al.*, 2014).

Tvoří velmi odolné biofilmy jak na abiotickém povrchu, tak uvnitř organismu (Murphy a Clegg, 2012).

### 4.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* se řadí mezi gramnegativní, pohyblivé, nefermentující bakterie s aerobním metabolismem. *P. aeruginosa* je klinicky nejvýznamnější z celého rodu. Někdy bývá obalena slizovou vrstvou, jež se podobá bakteriálnímu pouzdru. Vyskytuje se ubikvitárně, v půdě, na rostlinách i odpadních vodách. U člověka hlavně kolonizuje sliznice dýchacího a močového ústrojí. K nákaze může dojít i v nemocničním prostředí, ve formě biofilmu se objevuje na katetrech i dýchacích přístrojích (Votava, 2003).

Podle somatických antigenů, a antigenů vázaných na bičík a fimbrie rozlišujeme 17 sérotypů. Jako patogenní faktory u *Pseudomonas aeruginosa* vystupují extracelulární polysacharid (ochrana před imunitním systémem hostitele), slizová vrstva, lipopolysacharidový komplex, proteolytické enzymy (štěpí fibrin, elastin, kasein, kolagen), hemolyziny a toxiny (cytotoxin porušující membrány) (Votava, 2003).

*P. aeruginosa* je kultivačně velmi nenáročná, roste na základních půdách při pokojové teplotě. Kolonie mají typický vzhled, jejich zbarvení může být modrozelené (pigment pyocyanin) nebo žlutozelené (fluorescein), mají perleťový až kovový odlesk a okolo nich je zóna  $\beta$ -hemolýzy. *Pseudomonas aeruginosa* se vyznačuje i typickým zápachem (vůně jasmínového květu, či fialky) (Votava, 2003).

*Pseudomonas aeruginosa* je také silným producentem biofilmů, které mohou být inhibovány opět použitím medu manuka v krytí rány. (Enea Gino *et al.*, 2017); (Maddocks *et al.*, 2013).

Velmi často osidluje popáleniny, dekubity, žilní a neuropatické ulcerace (Azzopardi *et al.*, 2014); (Rhoads *et al.*, 2012).

A podporuje *E. coli* v tvorbě biofilmu (Culotti a Packman, 2014).

#### 4.2.4 *Acinetobacter baumannii*

Acinetobaktery patří mezi gramnegativní bakterie, které jsou nepohyblivé a negativní na katalázu. *Acinetobacter baumannii* tvoří sacharolytické komplexy s *Acinetobacter calcoaceticus*. Častý výskyt je u popálenin a jedinců s poruchou imunity. Dále jej nalezneme v hemokulturách. Mnohdy jsou tyto kmeny velmi polyrezistentní k běžně používaným antibakteriálním látkám, používají se proto karbapenemy, aminoglykosidy III. generace i fluorované chinoliny (Votava, 2003).

*Acinetobacter baumannii* velmi dobře tvoří biofilm na abiotickém povrchu i uvnitř organismu (Gaddy a Actis, 2009).

Až 92,9 % kmenů druhu *Acinetobacter baumannii* produkuje biofilm v nehojících se ranách a zpravidla jsou multirezistentní vůči antimikrobiálním látkám, s výjimkou polymyxinu B.

Tento druh je oportunistický patogen a často způsobuje nozokomiální nákazy (Rosales-Reyes *et al.*, 2015).

#### 4.2.5 *Enterobacter sp.*

Jde o ubikvitární pohyblivé opouzdřené bakterie. Rod zahrnuje 17 druhů, z nichž jsou významné zejména *E. aerogenes* a *E. cloacae*. Enterobaktery jsou součástí běžné střevní mikroflóry. Nebývají patogenní, ale mimo střevo mohou způsobit např. zánět močových cest nebo dokonce meningitidu u dětí (*E. sakazakii*). Podstatná je jejich přirozená rezistence na řadu antibiotik. Po *E. coli* jsou enterobaktery druhou nejběžnější bakterií lidského střeva. Tento rod je schopen využívat citrát jako zdroj uhlíku. (Votava, 2003).

*E. cloacae* je jedním z mikroorganismů, které nejčastěji kolonizují nehojící se ulcerace, jako jsou DFU, VLU (venózní ulcerace), DU (dekubit), nehojící se chirurgické rány a abscesy (Rahim *et al.*, 2017); (Enea Gino *et al.*, 2017).

Metodou na mikrotitrační destičce bylo potvrzeno, že vyizolované bakterie *E. cloacae* a *Proteus mirabilis* z ran, velmi snadno společně vytvářejí biofilm. (Wasfi *et al.*, 2012).

#### 4.2.6 *Proteus mirabilis*

Rod *Proteus* je odolný vůči podmínkám trávicího traktu, běžně se vykytuje ve střevě zvířat, ale nikoliv za fyziologických u člověka. Tento rod se vyznačuje typickým plazivým růstem na kultivačních půdách (Raussův fenomén), enormní proteolytickou aktivitou, štěpí močovinu, deaminuje fenylalanin a všechny jeho druhy tvoří indol, kromě *Proteus mirabilis*.

*P. mirabilis* osidluje močové cesty, dekubity a nehojící se rány. Má velkou schopnost společně s enterobaktery tvořit biofilm v nehojících se poraněních (Wasfi *et al.*, 2012); (Votava, 2003).

Odolnost těchto biofilmů a jejich odstranění z ran, jak již bylo uvedeno, velmi napomáhají hojivá krytí s obsahem medu (Majtan *et al.*, 2014).

#### **4.2.7 *Morganella morganii***

Rod *Morganella* byl dříve společně s rody *Proteus* a *Providencia* řazen do jednoho rodu. Kmeny *Morganella morganii* kolonizují močové ústrojí, nehojící se ulcerace a dekubity. *M. morganii* je oportunní patogen, ohrožuje novorozence, imunosuprimované jedince a onkologické pacienty či způsobuje nozokomiální infekce (Votava, 2003); (Chen *et al.*, 2012); (Enea Gino *et al.*, 2017).

*Morganella morganii* samostatně netvoří v ranách biofilm, ale potřebuje další bakteriální druhy pro vytvoření odolných společenstev (De *et al.*, 2017).

Na Tchaj-wanu je *M. morganii* devátým nejčastějším mikrobem, který způsobuje infekce chronických ran a zapříčiňuje zdejší vysokou úmrtnost (Chen *et al.*, 2012).

## 5 ZÁVĚR

Tato práce pojednává o mikrobiálním osídlení nehojících se ran.

Nejčastějším typem chronických ran jsou dekubity, venózní, neuropatické a arteriální ulcerace.

Bylo zjištěno, že tyto rány bývají kolonizovány až 17 druhů bakterií zároveň. Nehojící se rány bývají více než 50 % kolonizovány gramnegativními mikroorganismy, hlavně z čeledi *Enterobacteriaceae*. Nejčastěji se vyskytují kmeny *Pseudomonas aureginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* a *Klebsiella pneumoniae*. Nejhojnějším zástupcem grampozitivních bakterií v chronických ranách je *Staphylococcus aureus*, následovaný koaguláza negativními stafylokoky a *Streptococcus pyogenes*.

Infekce způsobená těmito druhy bakterií velmi znesnadňuje hojení chronických ran. Je tomu tak zejména proto, že v ranách tvoří biofilm, v němž mají změněné fenotypové vlastnosti a zvýšenou odolnost vůči antimikrobiálním látkám. Bylo zjištěno, že nejsilnější biofilmy produkují kmeny rodů *Proteus*, *Pseudomonas* a *Klebsiella*.

Z tohoto důvodu jsou v dnešní době stále vyvíjeny nové typy antimikrobiálních přípravků a nové postupy v hojení ran.

Infekce samotná není jediným faktorem, který ovlivňuje hojení ran. Z mnoha studií vyplývá, že správná počáteční diagnóza, kvalita péče o poranění, dodržování správně zvolených léčebných postupů a disciplína pacientů se jeví jako zásadní atributy pro úspěšné zotavení nehojících se ran.



## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABBAS, H. A., I. M. ABDO a M. Z. MOUSTAFA. In vitro antibacterial and antibiofilm activities of *Hibiscus sabdariffa* L. extract and apple vinegar against bacteria isolated from diabetic foot infections. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2014, **7** (2): 1-136. ISSN 09743618.
- ATKIN, L. Understanding methods of wound debridement. *British Journal of Nursing*. 2014, **23** (12). ISSN 09660461.
- AZZOPARDI, E. A., L. CAMILLERI, J. VILLAPALOS a D. E. BOYCE. Gram negative wound infection in hospitalised adult burn patients-systematic review and metanalysis. *PLoS One*. 2014, **9** (4): e95042.
- BARTOŠKA, P. Perianální píštěle. *Postgraduální medicína*. [online-odborný časopis]. 2007, **7**, dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/perianalni-pistele-319038>.
- BEDNÁŘ, M. *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. Praha: TRITON, 1994, **226** s. ISBN 80-901521-4-7.
- BISWAS, P., S. DEY, L. ADHIKARI a A. SEN. Virulence markers of vancomycin resistant enterococci isolated from infected and colonized patients. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2014, **6** (4): 157-163. ISSN 0974777X.
- BRANDENBURG, K. S., D. CALDERON, P. KIERSKI, A. BROWN a N. SHAH. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on wound dressings. *Wound Repair and Regeneration*. 2015, **23**(6): 842-854.
- COSTA, E. M., S. SILVA, F. TAVARIA a M. PINTADO. Insights into chitosan antibiofilm activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. 2017, **122** (6): 1547-1557.

- CULOTTI, A. a A. I. PACKMAN. *Pseudomonas aeruginosa* promotes *Escherichia coli* biofilm formation in nutrient-limited medium. *PLoS One*. 2014, **9** (9): e107186.
- CUNHA, M. L. R. S. a R. A. O. CALSOLARI. Toxigenicity in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: Epidemiological and molecular aspects. *Microbiology Insights*. 2008, **1**.
- DE, A., H. RAJ, J. HALDAR, P. MUKHERJEE a P. MAITI. Biofilm colonization in chronic treatment refractory infections presenting with discharging sinuses: A study in a tertiary care hospital of Eastern India. *Journal of Laboratory Physicians*. 2017, **9** (2), ISSN 09742727.
- DONELLI, G. a C. VUOTTO. Biofilm-based infections in long-term care facilities. *Future Microbiology*. 2014, **9** (2): 175-188. ISSN 1746-0913.
- DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2001, **33** (8): 1387-1392.
- DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 2002, **8** (9): 881-890.
- ENEA GINO, D., I. FARULLA, G. PRIGNANO, M. T. GALLO a M. VESPAZIANI. Biofilm is a major virulence determinant in bacterial colonization of chronic skin ulcers independently from the multidrug resistant phenotype. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, **18** (5): 1077.
- ENOCH, S. ABC of wound healing: Wound assessment. *Student BMJ*. 2006, **14**.
- FRENCH, V. M., R. A. COOPER a P. C. MOLAN. The antibacterial activity of honey against coagulase-negative staphylococci. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005, **56** (1): 228-231. ISSN 03057453.

- GADDY, J. A. a L. A. ACTIS. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiology*. 2009, **4** (3): 273-8. ISSN 1746-0913.
- GAJDOŠOVÁ, M., Z. VOCHYÁNOVÁ, V. OSTRÁ, R. GREC a V. PTÁČKOVÁ. Antibiotika a prebiotika v běžné lékařské praxi. *MIKROBIOM*. [online-odborný časopis]. 2015, **9**, dostupné z: <http://docplayer.cz/21351302-M-i-k-r-o-b-i-o-m-antibiotika-probiotika-a-prebiotika-v-bezne-lekarenske-praxi-zari-2015.html>.
- GREY, J. E., S. ENOCH a K. HARDING. Wound assessment. *BMJ (Clinical Research Ed.)*. 2006, **332** (7536): 285-288.
- HESS, C. T. Lower-extremity wound checklist. *Advances in Skin & Wound Care*. 2011, **24** (3): 144.
- HESS, C. T. Checklist for factors affecting wound healing. *Advances in skin & wound care*. 2011, **24** (4): 192-192.
- CHEN, Y., H. PENG, W. SHIA, F. HSU a C. KEN. Whole-genome sequencing and identification of *Morganella morganii* KT pathogenicity-related genes. *BMC Genomics*. 2012, **13**.
- JAUL, E. Non-healing wounds: the geriatric approach. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 2009, **49** (2): 224-226.
- LOPES, L. A. A., J. B. DOS SANTOS RODRIGUES, M. MAGNANI, E. L. DE SOUZA a J. P. DE SIQUERA-JÚNIOR. Inhibitory effects of flavonoids on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* that overexpresses efflux protein genes. *Microbial Pathogenesis*. 2017, **107**: 193-197.
- MADDOCKS, S. E., R. E. JENKINS, R. ELERI, R. S. ROWLANDS, K. J. PURDY. Manuka honey inhibits adhesion and invasion of medically important wound bacteria in vitro. *Future Microbiology*. 2013, **8** (12): 1523-36. ISSN 1746-0913.

- MAJTAN, J., J. BOHOVA, M. HORNIACKOVA, J. KLAUDINY a V. MAJTAN. Anti-biofilm effects of honey against wound pathogens *Proteus mirabilis* and *Enterobacter cloacae*. *Phytotherapy Research*. 2014, **28** (1): 69-75. ISSN 0951418X.
- MARTINS, M. A., S. SILVANA DE LIMA VIEIRA, L. LARA STEFANIA NETTO DE, A. N. PORTILHO a B. M. MÁRCIA. Prevalence of resistance phenotypes in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative isolates of venous ulcers of primary healthcare patients. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*. 2012, **45** (6), ISSN 00378682.
- MATHIEU, D. *Non-healing wounds*, Lille: Springer science & business media, 2006, **812** s. ISBN 978-1-4020-4448-9.
- MOORMEIER, D. E. a K. BAYLES. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular Microbiology*. 2017, **104** (3): 365-376.
- MOREIRA, S. Biofilm formation of environmental and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Masters Abstracts International*. 2010, **49** (4): 1-117.
- MURPHY, C. N. a S. CLEGG. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiology*. 2012, **7** (8): 991-1002. ISSN 1746-0913.
- NAVRÁTILOVÁ ZUZANA. Ulcus cruris – diagnostika a léčba. *Interní medicína pro praxi*. 2003, **4**: 184-189.
- NITHYANAND, P., R. THENMOZHI, J. RATHNA a S. KARUTHA. Inhibition of *Streptococcus pyogenes* biofilm formation by coral-associated actinomycetes. *Current Microbiology*. 2010, **60** (6): 454-60.
- OMAR, A., B. WRIGHT, G. SCHULTZ, R. BURRELL a P. NADWORNÝ. Microbial biofilms and chronic wounds. *Microorganisms*. 2017, **5** (1): 9.

- PERCIVAL, S. a K. CUTTING. Biofilms: possible strategies for suppression in chronic wounds. *Nursing Standard*. 2009, **23** (32): 64-72.
- RAHIM, K., S. SALEHA, X. ZHU, L. HUO a A. BASIT. Bacterial contribution in chronicity of wounds. *Microbial Ecology*. 2017, **73** (3): 710-721. ISSN 0095-3628.
- RASHID, T. *CLINICAL RHEUMATOLOGY*. 2007, **26** (6): 858-864.
- RHOADS, D. D., R. D. WOLCOTT, Y. SUN a S. DOWD. Comparison of culture and molecular identification of bacteria in chronic wounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012, **13** (3): 2535-2550.
- ROZEHNALOVÁ, Z., L. ŠIPULOVÁ, V. KRÍŽKOVÁ a Jana HERCOQOVÁ. Hojení bércových vředů. *Remedia* [online-odborný časopis]. 2008, **3**, dostupné z: <http://www.remedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2008/3-2008/Hojeni-bercovych-vredu/e-9q-a3-ju.magarticle.aspx>.
- STRYJA J. Nehojící se rány u diabetiků. *Medicína pro praxi*. 2015, **12**(2): 68-71.
- STRYJA J. *Repetitorium hojení ran*. Semily: GEUM, 2008, **199** s. ISBN 978-80-86256-79-5.
- STRYJA, J. Moderní postupy v léčbě nehojících se ran. *Remedia* [online-odborný časopis]. 2010, **3**, dostupné z: <http://www.remedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2010/3-2010/Moderni-postupy-v-lecbe-nehojicich-se-ran/e-Oa-SE-TD.magarticle.aspx>.
- VACHEVA, A., R. IVANOVA, T. PAUNOVA-KRASTEVA, S. STOITSOVA a A. VAN LEEUWENHOEK. Released products of pathogenic bacteria stimulate biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2012, **102** (1): 105-119. ISSN 0003-6072.
- VOTAVA M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, **495** s. ISBN 80-902896-6-5.

- WASFI, R., O, EL-RAHMAN, L. MANSOUR, A. HANORA a A. HASHEM. Antimicrobial activities against biofilm formed by *Proteus mirabilis* isolates from wound and urinary tract infections. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2012, **30** (1): 76-80.
- WEI-HUA, C., J. LEI-SHENG a Dai LI-YANG. Surgical treatment of pyogenic vertebral osteomyelitis with spinal instrumentation. *European Spine Journal*. 2007, **16** (9): 1307-1316. ISSN 09406719.
- WHITCHURCH, C. B., T. TOLKER-NIELSEN, P. RAGAS a S. JOHN. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 2002, **295** (5559): 1487.
- YAZGI, H. a M. H. UYANIK. Atypical colony morphology of *Staphylococcus lugdunensis* isolated from a wound specimen/*Staphylococcus lugdunensis*, atipik koloni Görünümü. *Eurasian Journal of Medicine*. 2010, **42** (1): 36-37. ISSN 13088734.
- YOTSU, R. R., P. NGOC MINH, O. MAKOTO, N. TAKESHI a S. HIROMI. Comparison of characteristics and healing course of diabetic foot ulcers by etiological classification: Neuropathic, ischemic, and neuro-ischemic type. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2014, **28** (4): 528-35.