

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2017

Bc. Nikola Schwanová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Výskyt mikroorganismů v nehojících se ranách
Bc. Nikola Schwanová

Diplomová práce
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 má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

Bc. Nikola Schwanová

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí své diplomové práce, Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. a také RNDr. Markétě Vydržalové, Ph.D. za pomoc při tvorbě této práce, trpělivost a vstřícný přístup, bez kterého bych tuto práci nedokončila. Dále bych také ráda poděkovala Mudr. Ondřeji Malému za poskytnutí vzorků a pomoc při hodnocení výsledků. Děkuji také doc. MVDr. Renátě Karpíškové, Ph.D. a Mgr. Tereze Gelbíčové, Ph.D. z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně a Oddělení klinické mikrobiologie Pardubické Nemocnice za pomoc při identifikacích pomocí MALDI – TOF MS. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu, kterou mi po celou dobu studia poskytovali.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá problematikou výskytu mikroorganismů v chronických ranách. Teoretická část je zaměřena na teorii ran, jejich rozdělení a také léčbu včetně materiálů používaných k hojení. Součástí je také popis nejčastěji izolovaných bakteriálních kmenů. Cílem experimentu byla identifikace aerobních i anaerobních mikroorganismů v chronických ranách. Následně byla testována citlivost anaerobních mikroorganismů na antibiotika pomocí diskové difúzní metody a výsledky byly porovnány s jinými studii.

KLÍČOVÁ SLOVA

Chronické rány, hojení ran, krytí ran, mikroorganismy, biofilm, antimikrobiální citlivost.

TITLE

Occurrence of microorganisms in chronic wounds.

ANNOTATION

This thesis deals with the occurrence of microorganisms in chronic wounds. The theoretical part focuses on the theory of wounds, their distribution and treatment, including materials used for healing. Also included is a description of the most commonly isolated bacterial strains. The aim of the experiment was the identification of aerobic and anaerobic microorganisms in chronic wounds. It was subsequently tested for sensitivity to antibiotics anaerobic microorganisms by disc diffusion method and the results were compared with other studies.

KEYWORDS

Chronic wounds, wound healing, wound dressings, microorganisms, biofilm, antimicrobial susceptibility.

OBSAH

ÚVOD.....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST	14
1. 1 Teorie ran a jejich rozdělení.....	14
1. 2 Hojení ran	15
1. 2. 1 Zánětlivá fáze.....	15
1. 2. 2 Proliferační fáze.....	15
1. 2. 3 Maturační fáze	16
1. 3 Léčba chronických ran	17
1. 3. 1 Débridement	18
1. 3. 2 Vlhká terapie	19
1. 3. 2. 1 Hydrogely.....	19
1. 3. 2. 2 Algináty.....	19
1. 3. 2. 3 Hydrokoloidy	20
1. 3. 2. 4 Hydropolymery a pěnová krytí	20
1. 3. 2. 5 Polopropustná filmová krytí.....	21
1. 3. 2. 6 Nepřilnavá krytí	21
1. 3. 2. 7 Antimikrobiální krytí a prostředky.....	21
1. 4 Nejčastěji izolované mikroorganismy	23
1. 4. 1 Rod <i>Staphylococcus</i>	23
1. 4. 1. 1 <i>Staphylococcus aureus</i>	24
1. 4. 1. 2 Koaguláza-negativní stafylokoky.....	24
1. 4. 2 Rod <i>Streptococcus</i>	25
1. 4. 2. 1 <i>Streptococcus agalactiae</i>	25
1. 4. 2. 2 <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	26
1. 4. 3 Rod <i>Corynebacterium</i>	26
1. 4. 3. 1 <i>Corynebacterium striatum</i>	26
1. 4. 4 Rod <i>Arcanobacterium</i>	27
1. 4. 5 Rod <i>Pseudomonas</i>	28
1. 4. 5. 1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
1. 4. 6 Čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>	28
1. 4. 6. 1 Rody fermentující laktózu.....	29
1. 4. 7 Čeleď <i>Morganellaceae</i>	29
1. 4. 8 Anaerobní bakterie.....	30
1. 4. 8. 1 Rod <i>Bacteroides</i>	30
1. 4. 8. 2 Rod <i>Peptostreptococcus</i>	31

1. 4. 8. 3 Rod <i>Finegoldia</i>	31
1. 4. 8. 4 Rod <i>Peptoniphilus</i>	32
1. 5 Biofilm	32
1. 6 Testování citlivosti na antibiotika	33
1. 5. 1 Disková difúzní metoda.....	33
1. 5. 2 Gradientová difúzní metoda – E-test	34
1. 5. 3 Bujónová diluční metoda	35
1. 5. 4 Agarová diluční metoda.....	36
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
2. 1 Vyšetřovaný materiál	38
2. 2 Přístroje a pomůcky.....	38
2. 3 Příprava kultivačních médií a roztoků	39
2. 3. 1 Krevní agar (KA).....	39
2. 3. 2 Xylóza-lysin-deoxycholátový agar (XLD).....	39
2. 3. 3 Brucellový bujón	39
2. 3. 4 Fyziologický roztok.....	40
2. 4. Identifikace mikroorganismů	40
2. 5 Testování citlivosti na antibiotika u anaerobních organismů.....	40
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	42
3. 1 Identifikované mikroorganismy	42
3. 2 Citlivost anaerobních bakterií na antibiotika	46
3. 2. 1 Stanovení citlivosti u <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	46
3. 2. 2 Stanovení citlivosti u <i>Peptoniphilus harei</i>	48
3. 2. 3 Stanovení citlivosti u <i>Finegoldia magna</i>	49
POUŽITÁ LITERATURA	53
ZDROJE OBRÁZKŮ.....	66
PŘÍLOHY.....	67

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Fáze hojení: a) zánětlivá fáze; b) proliferační fáze; c) maturační fáze	16
Obrázek 2 Antimikrobiální účinky stříbra	22
Obrázek 3 <i>Corynebacterium striatum</i> barvené dle Grama	27
Obrázek 4 Měření inhibičních zón- vlevo: manuálně; vpravo: digitálním zařízením	34
Obrázek 5 Odečítání hodnoty MIC u E-testu	35
Obrázek 6 Zkumavková diluční metoda	36
Obrázek 7 Mikrodiluční metoda	36

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Antibiotické disky pro základní testování citlivosti anaer. mikroorganismů	41
Tabulka 2 Etiologie rány a nejčastější mikroorganismy	42
Tabulka 3 Etiologie rány a nejčastější mikroorganismy - pokračování.....	43
Tabulka 4 Citlivost <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> 1 na vybraná antibiotika	46
Tabulka 5 Citlivost <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> 2 na vybraná antibiotika	47
Tabulka 6 Citlivost <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> 3 na vybraná antibiotika	47
Tabulka 7 Citlivost <i>Peptoniphilus harei</i> 1 na vybraná antibiotika	48
Tabulka 8 Citlivost <i>Peptoniphilus harei</i> 2 na vybraná antibiotika	48
Tabulka 9 Citlivost <i>Peptoniphilus harei</i> 3 na vybraná antibiotika	48
Tabulka 10 Citlivost <i>Finegoldia magna</i> na vybraná antibiotika	49

Seznam zkratek

<i>A.bernardiae</i>	<i>Arcanobacterium bernardiae</i>
<i>A. haemolyticum</i>	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>
<i>A. pyogenes</i>	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
<i>B. fragilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
β-NAD	Beta nikotinamid dinukleotid
<i>C. freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
CLSI	Clinical and laboratory standards institute (Klinický a laboratorní institut pro normalizaci)
<i>Cor. amycolatum</i>	<i>Corynebacterium amycolatum</i>
<i>Cor. jeikeium</i>	<i>Corynebacterium jeikeium</i>
<i>Cor. striatum</i>	<i>Corynebacterium striatum</i>
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EUCAST	European comittee on antimicrobial susceptibility testing (Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti)
FAF	<i>Fingoldia magna</i> adhezivní faktor
<i>F. magna</i>	<i>Fingoldia magna</i>
GPAC	Gram-pozitivní anaerobní koky
KA	Krevní agar
LDN	Léčba dlouhodobě nemocných
LPS	Lipopolysacharid
MALDI-TOF MS	Matrix assisted laser desorption/ionisation- time of flight mass spectrometry (Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s detektorem doby letu)
MHB	Mueller-Hintonův bujón
MIC	Minimum inhibitory concentration (Minimální inhibiční koncentrace)
PAB	Peptostreptokokový albumin vázající protein
<i>P. ivorii</i>	<i>Peptoniphilus ivorii</i>
<i>Pep. anaerobius</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Pep. canis</i>	<i>Peptostreptococcus canis</i>
<i>Pep. stomatis</i>	<i>Peptostreptococcus stomatis</i>

PHMB	Polyhexamethylen biguanid
<i>Pr. vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Prov. stuartii</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>S. warneri</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>
SDSE	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
Suf A	Subtiláza <i>Fingoldia magna</i>
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TIME	Tissue, infection, moisture regulation, epithalization (Tkáň, infekce, regulace vlhkosti, epitelizace)
TSA	Trypton-sójový agar
XLD	Xylóza-lysin-deoxycholátový agar

ÚVOD

Tato diplomová práce se věnuje mikrobiální kontaminaci chronických ran, která je jednou z hlavních příčin zpomalení procesu hojení. Chronické rány často vznikají z ran akutních, ale jsou i komplikací např. při chronických onemocněních jako je diabetes mellitus nebo ischemická choroba dolních končetin. Mezi nejčastější ulcerace se řadí bérkové vředy žilní nebo arteriální, diabetické vředy a dekubity. Hlavní příčinou vzniku defektu je porucha krevního zásobení, ke které dochází z mnoha důvodů.

Nejvíce tedy záleží na přístupu a vzdělanosti zdravotnického personálu, jejichž hlavním úkolem je správně identifikovat příčinu vzniku defektu a následně použít adekvátní postup léčby. Každá rána je jiného charakteru a existuje také mnoho faktorů, které ovlivňují dobu hojení. Některé z nich může ovlivnit pacient sám, jedná se např. o kouření, životosprávu nebo tělesnou váhu. Existují však komplikace, které nelze předvídat, příkladem může být osídlení rány bakteriemi. Zde záleží na včasném rozpoznání infikované rány a zahájení léčby antimikrobiálními prostředky.

Chronické rány zůstávají dlouhodobě otevřené a navíc obsahují devitalizovanou tkáň a další látky, které jsou vhodné pro mikrobiální růst. Kolonizace ve formě biofilmu jsou hlavním problémem při hojení. Přejít do infekce závisí na mnoha faktorech jako je množství bakterií nebo stav imunitního systému pacienta. Mikroorganismy v ráně pocházejí nejčastěji ze životního prostředí nebo přímo od pacienta. Jedná se o bakterie kožní mikroflóry nebo bakterie gastrointestinálního či urogenitálního traktu. K léčbě se dnes používají hlavně antimikrobiální prostředky na bázi stříbra, jódu nebo aktivního uhlí. Antibiotika nejsou vhodná z důvodu stále rostoucí rezistence bakterií.

Cílem tohoto experimentu bylo identifikovat aerobní i anaerobní bakterie z různých druhů chronických ran. Aerobní bakterie byly identifikovány zejména na základě biochemických testů, popřípadě stejně jako anaerobní organismy pomocí MALDI-TOF MS. U izolovaných anaerobních bakterií byla následně testována citlivost na antibiotika pomocí diskové difúzní metody. Výsledky byly porovnány s výsledky jiných studií.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1. 1 Teorie ran a jejich rozdělení

Rána je definována jako poškození normální anatomické struktury kůže nebo narušení její funkce (Velnar *et al.*, 2009). Existuje rozdělení ran podle způsobu vzniku, rozsahu nebo dle průběhu. Podle průběhu rozdělujeme rány na akutní a chronické (Pospíšilová a Švestková, 2001).

Akutní rány jsou rány, které se zhojí v krátkém časovém období s minimálním zjizvením. Výsledkem jsou strukturálně i funkčně podobné tkáně. Nejčastěji vznikají v důsledku mechanického poškození např. odřeniny, řezné rány, chirurgické řezy nebo popáleniny a poleptání chemickými látkami (Velnar *et al.*, 2009; Boateng *et al.*, 2008).

Chronickou ránu označujeme jako ránu sekundárně se hojící nebo od roku 2010 jako ránu nehojící se (non-healing wound), která i přes odpovídající léčbu nevykazuje po dobu 6-9 týdnů tendenci k hojení. Tyto rány jsou často rezistentní k přirozenému uzdravení a vyžadují dlouhotrvající lékařskou péči (Stryja *et al.*, 2011; Dowd *et al.*, 2008b). Léčebný proces může být narušen různými faktory, které prodlužují jednu nebo více fází hojení. Podobné znaky narušeného hojení se mohou vyskytovat i u komplikovaných akutních ran a postupy používané v jejich ošetřování se podobají léčbě chronických ran (Stryja *et al.*, 2011; Velnar *et al.*, 2009).

Pospíšilová (2012) uvádí jednu z možných klasifikací ulcerací, ale tento systém dělení nemůže být považován za dokonalý, protože nelze přesně vystihnout celý komplex symptomů. Platí ale základní rozdělení na ulcerace ze zevních příčin, kam se řadí například ulcerace tlakové neboli dekubity a ulcerace z vnitřních příčin. Do této skupiny řadíme například žilní bérčové vředy, ulcerace arteriální nebo ulcerace z metabolických příčin, jako jsou diabetické vředy (Pospíšilová, 2012).

Nejčastěji pacienti trpí bérčovými vředy ze žilních příčin, které tvoří asi 57- 85 % z celkového spektra ulcerací. Jako další jsou ulcerace tepenného původu 5-20 %, ulcerace diabetické 5-10 % a ostatní 5 %. Bérčové vředy jsou převládající, patologická onemocnění dolních končetin, které je velmi náročné z hlediska financí a zdravotnické péče (Pospíšilová, 2012; Ma *et al.*, 2014).

1. 2 Hojení ran

Hojení ran zůstává klinickým problémem, velmi zásadní je správný a efektivní management hojení ran. Hodně úsilí je vynaloženo na ošetřování ran s důrazem na vývoj nových terapeutických postupů pro akutní i chronické rány (Velnar *et al.*, 2009).

Průběh hojení není ještě zcela prozkoumán, což způsobuje mnohé problémy, zvláště pokud se jedná o patologický případ. Hojení ran je složitý proces, který může být rozdělen na 3 vzájemně se prolínající fáze tj. fázi zánětlivou (exsudativní), proliferační fázi a nakonec reepitalizační (Li *et al.*, 2007; Pospíšilová a Švestková, 2001).

1. 2. 1 Zánětlivá fáze

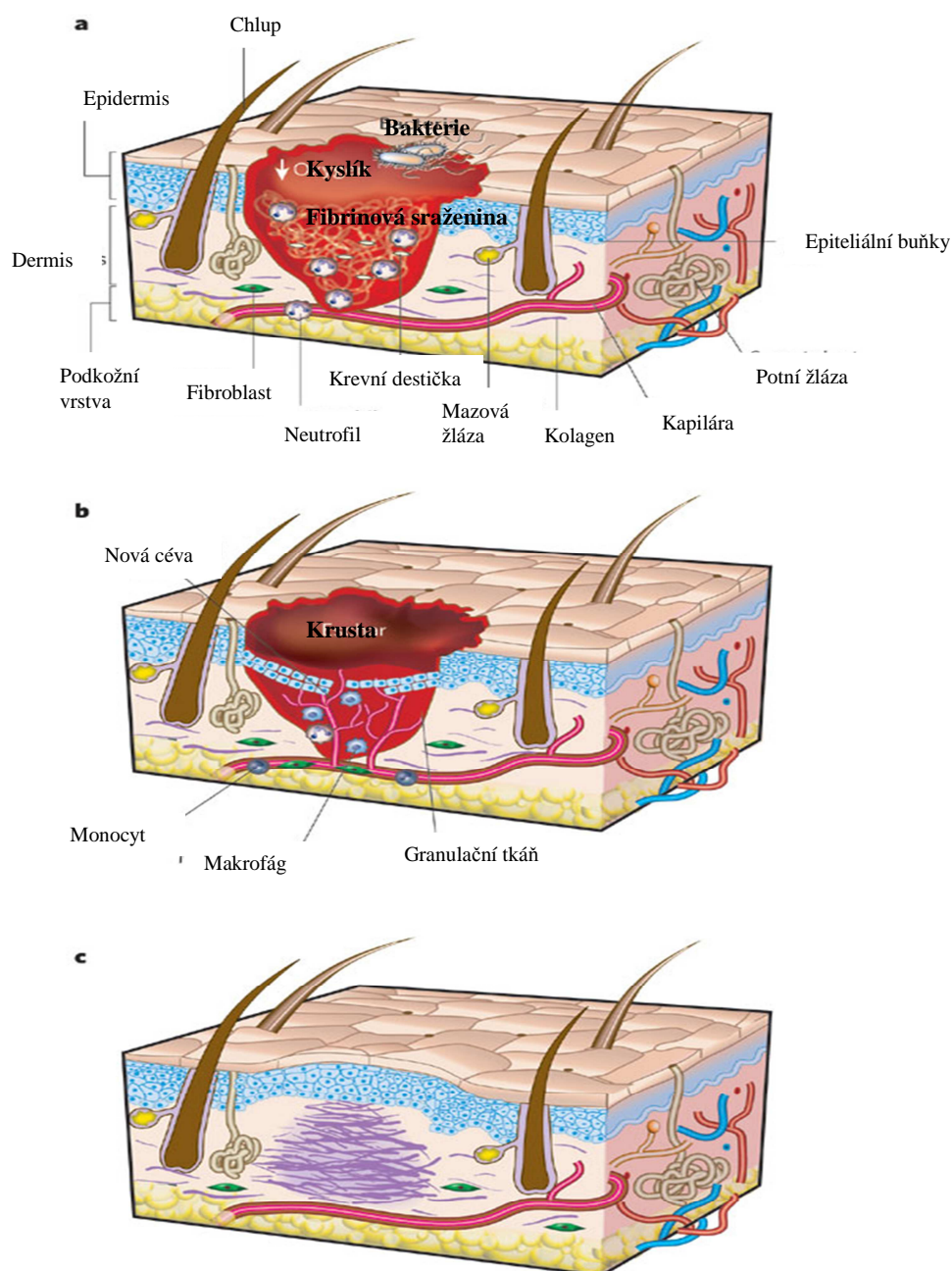
Zánětlivá fáze začíná bezprostředně po poranění tkáně a trvá asi 3 dny (Shipperley a Martin, 2002). Hlavním účelem je zástava krvácení vazokonstrikcí, což znamená vznik krevní sraženiny (Ng, 2010). Bez této reakce nemůže léčení probíhat (Hart, 2002). Po zástavě krvácení dojde k dilataci cév uvnitř rány, čímž je umožněn vstup buněk nezbytných pro hojení. V okolí rány jsou během této fáze patrné tzv. Celsovy znaky zánětu rubor, calor, dolor, tumor, functio laesa (Monaco a Lawrence, 2003; Stryja *et al.*, 2011).

1. 2. 2 Proliferační fáze

Proliferační fáze začíná asi čtvrtý den po poranění a trvá celkem asi 20 dní. V této fázi se vytváří nová tkáň, a to pomocí fibroblastů, což jsou buňky zodpovědné za vývoj nových cév a také kolagenu a dalších pojivových tkání (Shipperley a Martin, 2002). Drobné nové kapiláry tvoří jakési lešení uvnitř rány, díky kterému vznikne granulační tkáň, která vyplní dutinu rány (Martin, 2013). Granulační tkáň je světle růžová, ale s rozvojem nových cév se barví do jasně červené (Sussman a Bates-Jensen, 2011). Epiteliální buňky na okraji rány se přesouvají přes nově vytvořený granulát a zmenšují tak velikost rány a postupně ji uzavírají. Výsledkem oprav je jizva, což je tenká náhradní epidermis chudá na cévy, bez přídatných žláz nebo vlasových váčků (Stryja *et al.*, 2011).

1. 2. 3 Maturační fáze

Maturační fáze neboli fáze vyvrávací začíná asi 21. den po poranění. Během této fáze dochází k remodelaci kolagenu v ráně pomocí makrofágů, čímž je zvýšena odolnost jizvy vůči tahu. Kolagen typu III obsažený v granulační fázi je nahrazen kolagenem typu I. Jizva postupem času vybledne a teprve po 2 letech dosahuje asi 80 % pevnosti původní tkáně (Diegelmann a Evans, 2004; Stryja *et al.*, 2011).



Obrázek 1 Fáze hojení: a) zánětlivá fáze; b) proliferační fáze; c) maturační fáze (<http://www.nature.com/nature/journal/v453/n7193/images/nature07039-f1.2.jpg>, [cit. 7. 3. 2017])

K pochopení hojení ran nestačí znát pouze zánětlivou, proliferační a vyzrívací fázi. Hojení ran je komplexní série reakcí a interakcí mezi buňkami a mediátory. Mediátory jsou vnitřní nebo vnější a jejich působení je lokální, tedy přímo v ráně nebo systematické, mohou souviset s celkovým stavem pacienta (Broughton *et al.*, 2006). Biologické faktory interferují s jednou nebo více fázemi tohoto procesu a způsobují tak nesprávné hojení. Je důležité, aby fáze hojení začali ve správném pořadí, v určitém čase a s určitou intenzitou. Každoročně jsou objevovány další a další mediátory ovlivňující hojení ran a roste porozumění způsobu jejich působení (Guo a Di Pietro, 2010; Broughton *et al.*, 2006).

U chronických ran se průběh hojení liší případ od případu, je ovlivňován hemodynamickými a metabolickými poruchami, přítomností buněčného detritu (neživé organické hmoty), hnisu, nekrotické a devitalizované tkáně v ráně, bakteriemi, viry a plísněmi osidlujícími spodinu rány (Pospíšilová a Švestková, 2001).

1. 3 Léčba chronických ran

Pro efektivní léčbu je důležité diagnostikovat příčinu vzniku chronické rány, na základě diagnózy je pak konkrétnímu pacientovi stanoven optimální léčebný plán. Chronické rány jsou z hlediska etiologie velmi rozmanitá skupina, ke každé se musí přistupovat jinak. U arteriálních vředů je primární snahou zlepšení cévního prokrvení, u diabetických ulcerací hlavně kompenzace diabetu a u venózních bércových vředů je to odstranění patologického refluxu v žilním systému, nebo léčba zevní kompresí. V mnoha případech se ukáže, že odstranění základní příčiny rány a současně bolesti může být obtížné, ne-li nemožné (Pospíšilová, 2010; White, 2008).

Bolest u pacientů s chronickými ranami je variabilní a multikauzální (Hollinworth, 2005). Pro extrémní postupy jako například débridement hlubokých vředů je vhodné zvážit možnost celkové anestezie (White, 2008). Většinu bolesti a trauma během převazů se podařilo zmírnit používáním vlhkého krytí (Rippon *et al.*, 2008). Tzv. vlhká terapie rány postupně nahrazuje dosud používanou „klasickou“ terapii. Již v roce 1962 profesor Winter jako první popsal, že udržování rány ve vlhkém stavu urychluje reepitelizaci (Pospíšilová a Švestková, 2001).

Tradiční terapie zahrnuje lokální kapalná a polotuhá léčiva (masti s antibiotiky, barevné tinktury, masti a pasty s obsahem kovů jako je zinek, stříbro atd.) a tradiční suché obvazy (vata, přírodní nebo syntetická gáza a obvazy). Častá výměna obvazů je riziková z hlediska bakteriální infekce, opakované obklady navíc snižují teplotu v ráně a tím zpomalují hojení. Konkrétní krycí prostředek musí respektovat charakter spodiny rány a intenzitu sekrece a musí postupně vytvářet fyziologické prostředí vhodné pro reparační procesy (Pospíšilová a Švestková, 2001; Boateng *et al.*, 2008).

1. 3. 1 Débridement

Prvním předpokladem pro zdárné zhojení ulcerace je débridement. Profesor F. Gottrup z University v dánském Odense (Centrum hojení ran) definuje débridement jako odstranění cizího materiálu a nekrotických nebo kontaminovaných tkání z traumatické nebo infikované léze (Stryja *et al.*, 2011). Odumřelá tkáň zabraňuje hojení a často se pod ni hromadí hnisavý exsudát, který zesiluje zánět a zhoršuje bolest. Devitalizovaná tkáň vytváří vhodné médium pro růst bakterií, o němž pak svědčí žlutavě nebo šedozeleně zbarvený povlak (Pospíšilová, 2009).

Débridement lze provést několika způsoby, zaprvé mechanickým odstraněním nekrotické tkáně až ke spodině, které je ale doprovázeno silnou bolestí, proto se příliš nevyužívá. Druhou možností je autolytický débridement, který je založen na principu vytvoření vlhkého prostředí, ve kterém dochází k rehydrataci nekrotické tkáně a k uvolnění odumřelé tkáně vlastními enzymy. Používají se hydrokoloidy, kompaktní gely, amorfni gely, hydropolymery atd. Třetí způsob, tzv. chemický débridement se provádí pomocí chemických sloučenin jako například kyseliny benzoové, kyseliny salicylové, 40 % urey nebo chlornanů. Tyto látky mají schopnost rozkládat nekrotickou tkáň, rizikem je ale jejich toxické působení na organismus. Poslední možností je enzymatický débridement, který využívá k odstranění nekrózy prostředky obsahující proteolytické enzymy jako např. kolagenázu, fibrinolysin apod. K enzymatickému débridementu bývá zařazována také larvoterapie, kdy se využívají larvy bzučivky zelené, které svými trávicími enzymy rozpouštějí nekrotickou tkáň a zároveň nenarušují živou tkáň (Fonder *et al.*, 2008; Stryja *et al.*, 2011; Pospíšilová, 2009).

1. 3. 2 Vlhká terapie

Je známo, že pouze kůže je schopna zajistit dokonalé podmínky pro hojení. Nicméně podmínky v prostředí rány mohou být optimalizovány pomocí lokální léčby založené na tzv. TIME principech (Jawień *et al.*, 2011). TIME systém charakterizuje jednotlivé fáze rány, jimiž hojení rány prochází. T znamená neživá nekrotická tkáň, I reprezentuje infekci/zánět, M jako management exsudátu a regulace vlhkosti a E znamená epitelizace (Mrázová *et al.*, 2012).

Před výběrem vhodného krytí je nutné posoudit charakter rány. Rány mohou být podle vzhledu rozděleny na nekrotické, mokvající (povleklé), granulační, epitelizační nebo infekční. Dalšími důležitými faktory jsou umístění rány, vzhled okolní kůže a úroveň exsudace (Abdelrahman a Newton, 2011; Mrázová *et al.*, 2012).

1. 3. 2. 1 Hydrogely

Hydrogely jsou dostupné v plošné formě nebo jako amorfni hmota (nejčastěji v tubě). Skládají se z matrice z nerozpustných polymerů, která obsahuje až 96 % vody. Voda napomáhá autolytickému odstranění devitalizované tkáně, zároveň pak materiál absorbuje přebytečný exsudát. Nejčastěji se využívají v čistící fázi hojení, ale lze je aplikovat ve všech fázích (od rány nekrotické až po epitelizační). Propouští vodní páru a kyslík a jejich propustnost pro bakterie a tekutiny závisí na typu sekundárního krytí, které nesmí hlavně absorbovat gel samotný. Další výhodou je, že jsou částečně průhledné a umožňují tak zrakovou kontrolu rány. Dokonale se přizpůsobují spodině rány a minimalizují bolest při převazu. Nevýhodou je nutná častější výměna hydrogelů, maximální interval je 72 hodin v závislosti na typu sekrece (Jones *et al.*, 2006; Mrázová *et al.*, 2012). Příkladem hydrogelového materiálu je NU-GELTM nebo INTRASITE[◇] GEL.

1. 3. 2. 2 Algináty

Alginát vápenatý je získáván extrakcí z hnědých mořských řas. Jedná se polymer skládající se z 2 podjednotek (G a M) v různém procentuálním zastoupení. Principem jejich funkce je výměna sodných iontů z raného exsudátu za vápenaté ionty alginátu. Touto výměnou dojde ke změně vláknité struktury alginátu na hydrofilní gel, který absorbuje

přebytečný exsudát i tkáňový detritus. Algináty mohou absorbovat 15 až 20 násobek své hmotnosti, jsou tedy vhodné pro silně secernující rány. Kvalita materiálu závisí i na obsahu kyseliny α -L- glukuronové (G) a kyseliny β -D- mannuronové (M) tvořících alginát (Timmons, 1999). Materiály s vyšším obsahem G alginátu jsou pevnější v tahu a vytvořený gel se z rány odstraní v 1 kuse, příkladem je SilvercelTM Non-Adherent. Absorpční schopnost materiálu může být zvýšena přítomností karboxy-methylcelulózy. Vápenatý ion navíc působí jako hemostatikum, proto se algináty využívají zejména v prvních dnech po radikálnějším vyčištění spodiny rány (Abdelrahman a Newton, 2011; Jones *et al.*, 2006; Mrázová *et al.*, 2012). Alginát obsahují například materiály Melgisorb® nebo Sorbsan.

1. 3. 2. 3 Hydrokoloidy

Hydrokoloidy jsou nejstarší z materiálů používaných pro vlhké hojení ran, skládají se z hydrokoloidní matrix tvořené karboxy-methylcelulózou, želatinou, pektinem a dalšími látkami. Jsou v podstatě nepropustné pro vodní páru a kyslík, vytváří tak v ráně hypoxické prostředí s nízkým pH a tím podporují angiogenezi a granulaci. Jsou určeny pro rány s nízkou až střední exsudací. Absorpcí exsudátu je vytvořen gel na povrchu rány. Naprosto nevhodné jsou pro rány infikované, kde je riziko množení mikroorganismů (Abdelrahman a Newton, 2011; Jones *et al.*, 2006; Mrázová *et al.*, 2012).

1. 3. 2. 4 Hydropolyмеры a pěnová krytí

Materiály na bázi polyuretanových či silikonových pěn nebo hydropolymerů v posledních letech nahrazují hydrokoloidy. Jejich hlavní výhodou je velmi silná absorpční schopnost, která je dána přítomností svého jádra ze suchého hydrogelu nebo karboxy-methylcelulózy. Při absorpci exsudátu dochází k vertikálnímu prosakování do jednotlivých vrstev materiálu, čímž se snižuje riziko macerace rány. Zároveň s tekutinou jsou pohlcovány i bakterie z rány (Demling, 2001; Lansdown, 2002). V ideálním případě lze takový materiál měnit až po 7 dnech (Abdelrahman a Newton, 2011; Mrázová *et al.*, 2012). Jako příklad můžeme jmenovat krytí AQUACELTM, GranuFlex®, Biatain® nebo ALLEVYN[◇].

1. 3. 2. 5 Polopropustná filmová krytí

Filmová krytí ve spreji na bázi polyuretanu či silikonu jsou vhodná pro ochranu epitelizační fáze hojení rány. Tenký film adhezuje na neporušenou kůži v okolí rány nejčastěji pomocí akrylátového hypoalergenního lepidla. Tyto materiály umožňují přenos vodní páry, ale neabsorbují exsudát. Tvoří tedy ochranné (voděodolné) prostředí nepropustné pro bakterie a mohou zůstat bez výměny i 7 dní (Abdelrahman a Newton, 2011; Mrázová *et al.*, 2012). Příkladem filmového krytí je výrobek Mepitel®.

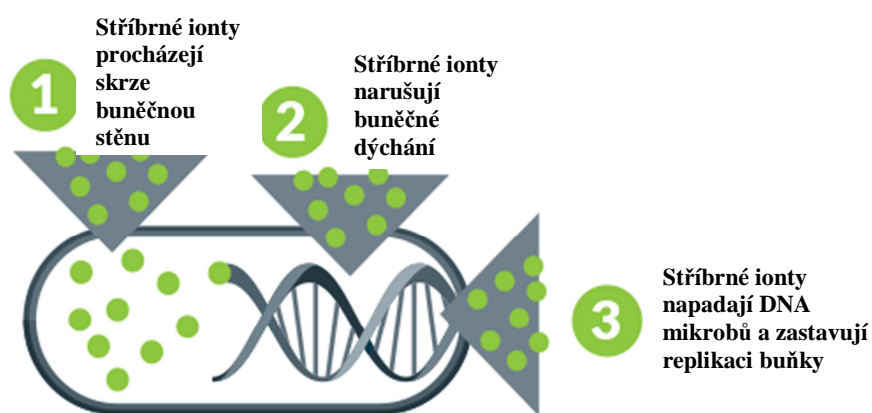
1. 3. 2. 6 Nepřilnavá krytí

Nepřilnavé obvazy jsou nejčastěji vyrobeny z jemné tkaniny či síťoviny, které neadherují na povrch rány. Tvoří tak rozhraní mezi spodinou rány a sekundárním krytím a umožňují volný průchod exsudátu, který je zachycován vrchním obvazem. Jsou vhodné zejména pro pacienty s jemnou kůží. Nepřilnavost můžeme zvýšit impregnací silikonem nebo parafínem (Abdelrahman a Newton, 2011; Jones *et al.*, 2006). Nepřilnavými obvazy jsou BACTIGRAS[◇], Atrauman® nebo Mepilex®.

1. 3. 2. 7 Antimikrobiální krytí a prostředky

Samotná přítomnost bakterií na spodině rány potvrzená mikrobiologickým vyšetřením k diagnostice infekce nestačí. Ke zpomalení nebo zástavě hojení dochází, když počet a vzájemná spolupráce mikroorganismů a spodině rány dosáhnou určité úrovně (Stryja, 2017). Na základě tzv. racionální antibiotické terapie je nutné správně diagnostikovat hlubokou rannou infekci, jejíž léčba je založena na použití antibiotik, která jsou spojována s rizikem vzniku rezistence (Stryja, 2017; Leaper, 2006). Dnes jsou hojně používány antiseptické přípravky a krytí se stříbrem, jódem, zinkem nebo s obsahem chlorhexidinu, betainu, polyhexamethylen biguanid (PHMB), které inhibují růst a vývoj mikroorganismů (Agren *et al.*, 2006; Stryja, 2017). Používají se také přípravky s aktivním uhlím (například ACTISORB®), které mají bakteriostatické až bakteriocidní účinky a velmi často jsou také doplněny stříbrem (ACTISORBTM Silver 220). Na povrch aktivního uhlí adhezuje metaloproteázy, endo- a exotoxiny včetně bakterií a zároveň aktivní uhlí absorbuje zápach (Stryja, 2017; Leaper, 2006); Stephen-Haynes a Toner, 2007).

V obvazových materiálech se využívají 2 formy stříbra. Stříbrné soli, například sulfadiazin stříbrný a elementární stříbro, které disociuje na stříbrný kation (Bowler *et al.*, 2001). Stříbrné ionty jsou vysoce reaktivní, váží se na buněčné stěny bakterií, čímž je narušují a kvůli úniku buněčného obsahu dojde ke smrti buňky. Ovlivňují také buněčné dýchání tím, že inhibují oxidační enzymy (Lansdown, 2002). V cytoplasmě se pak váží na ribonukleové kyseliny a proteiny a znemožňují dělení bakteriálních buněk (Agranoff a Krischna, 1998). Většina dnešních materiálů obsahuje stříbro, jako příklad bych uvedla AQUACEL™ Ag, Mepilex® Ag, Silvercel™ Non-Adherent, Askina® Calgitrol® Ag, Atrauman® Ag. Výhodou použití stříbra je jeho minimální toxicita a nežádoucí účinky a navíc nebyla hlášena existence mikroorganismu rezistentního na stříbro (Demling, 2001).



Obrázek 2 Antimikrobiální účinky stříbra (http://www.linnea.ch/media/5003/schema_03.gif, [cit. 7. 3. 2017])

Jód je používán ve formě jodovaného povidonu, tedy komplexu jódu a polyvinylpyrrolidonu nebo jako cadexomer jódu, což je modifikovaný škrobový polymer s 0,9 % jódu (Jones *et al.*, 2006). Jód také způsobuje ztrátu buněčného obsahu a smrt buňky, ve formě cadexomeru je navíc účinný i proti biofilmu (Akiyama *et al.*, 2004). Příkladem materiálů s obsahem jódu jsou INADINE*, IODOSORB[◊], Braunol nebo Braunovidon®.

Stejným způsobem jako jód účinkuje i PHMB (polyhexamethylen biguanid), který je spolu s betainem obsažen například v prostředku Prontosan® wound gel nebo roztok, který se používá k čištění ran (Smith, 2013).

Pro výběr vhodného krytí existuje mnoho kritérií, netýkají se pouze stavu pacienta, ale mnohdy i finančních možností zdravotnického zařízení, například LDN. Je nutné říci, že ideální krycí materiál neexistuje. V praxi bývá zvykem, že pokud nedojde k vyčištění defektu do 1-2 týdnů, tak je materiál nahrazen jiným (Mrázová *et al.*, 2012). Kromě přípravků

ke zlepšení hojení či čištění rány bývá léčba doplněna materiály s ibuprofenem, který působí proti bolesti (například Biatain® Ibu).

1. 4 Nejčastěji izolované mikroorganismy

Chronické rány zůstávají dlouhodobě otevřené, což přispívá k jejich kolonizaci, přítomný kolagen a fibronektin navíc usnadňují přilnutí bakterií. V případě devitalizované tkáně (např. ischemické, hypoxické nebo nekrotické) a poškození imunitního systému hostitele se podmínky stávají optimálními pro mikrobiální růst (Scali a Kunimoto, 2013; Bowler *et al.*, 2001).

Aerobní patogeny jako *S. aureus*, *Ps. aeruginosa* a β - hemolytické streptokoky jsou považovány za hlavní příčiny pomalého hojení akutních a chronických ran. A to hlavně pro jejich schopnost produkovat potenciálně destruktivní faktory virulence (Bowler *et al.*, 2001). Dříve byly analýzy chronických ran zaměřeny hlavně na aerobní bakterie, a to zřejmě z důvodu složitějšího odběru, přepravy, kultivace i izolace anaerobních bakterií. Ale studie z 80. a 90. let 20. století dokázaly, že anaerobní bakterie se vyskytovaly v 38 % vyšetřeného biologického materiálu. Mnoho z nesporelujících gramnegativních anaerobů také produkuje řadu faktorů virulence, které zhoršují hojení ran (Bowler *et al.*, 2001; Wall *et al.*, 2002).

1. 4. 1 Rod *Staphylococcus*

Rod *Staphylococcus* patří společně s mikrokoky do čeledi *Micrococcaceae*, přestože jsou genotypově i fenotypově odlišné. V květnu 2015 rod *Staphylococcus* zahrnoval celkem 63 taxonů, z nichž pouze některé jsou významné v humánní medicíně. Klinický význam mají pak zejména *Staphylococcus aureus* a koaguláza-negativní *Staphylococcus epidermidis* a *S. warneri* (Tadesse a Alem, 2006; Švec *et al.*, 2015).

Stafylokoky jsou gram-pozitivní, nesporelující, nepohyblivé a většinou neopouzřené koky obvykle uspořádané v hroznech, tetradách, párech či jednotlivě. Na rozdíl od mikrokoků mají fermentační i respirační typ metabolismu, jsou tedy fakultativně anaerobní (mikrokoky striktně aerobní). Od streptokoků je lze odlišit produkcí katalázy, kterou mají stafylokoky pozitivní. Oxidázu netvoří. Stafylokoky jsou odolné vůči vlivům zevního prostředí, jako je vyšší teplota nebo vyšší koncentrace NaCl. Díky těmto vlastnostem mohou být součástí

normální mikroflóry kůže a sliznic. Stafylokoky nejsou příliš kultivačně náročné, rostou i na běžných médiích jako je krevní agar nejlépe za 24 hodin při 37 °C. Kolonie vyrůstající na pevných půdách jsou kulaté, hladké, vyvýšené a lesknou se. Některé druhy produkují ve vodě nerozpustné pigmenty, které zbarvují kolonie krémově, žlutě až oranžově (Tadesse a Alem, 2006; Missiakas a Schneewind, 2015).

1. 4. 1. 1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus patří mezi biochemicky neaktivnější bakteriální druhy a řadíme ho ke koaguláza-pozitivním stafylokokům. Produkuje řadu antigenů buněčné stěny, exoenzymů a toxinů, které se často uplatňují jako faktory virulence. *S. aureus* kolonizuje kůži a sliznice a spolu se streptokoky je nejčastějším původcem pyogenních infekcí. Zásadní biologickou vlastností *S. aureus* je schopnost asymptomaticky kolonizovat zdravé jedince. U nosičů je prokázáno vyšší riziko infekce a jsou navíc zdrojem nákazy. *Staphylococcus aureus* je diagnostikován zejména na základě mikroskopického vyšetření preparátu obarveného dle Grama (G+ koky ve shlucích) a kultivace na krevním agaru (charakteristické zlaté kolonie a dvojitá hemolýza). Při 24 hodinové kultivaci mohou být kolonie nažloutlé, krémové nebo bílé (Tadesse a Alem, 2006; Bien *et al.*, 2011).

1. 4. 1. 2 Koaguláza-negativní stafylokoky

Koaguláza-negativní stafylokoky jsou běžnou součástí mikroflóry kůže a sliznic u lidí i zvířat. Původně byly považovány za nepatogenní, ale v poslední době se stále častěji podílejí na závažných infekcích u oslabených pacientů (popáleniny, těžké úrazy a chirurgické zákroky, imunologická nedostatečnost). Typickým zástupcem je *Staphylococcus epidermidis*, který netvoří výrazný pigment. *S. epidermidis* převládá na vlhčích místech pokožky jako je podpaží, třísla nebo nosní sliznice. Bylo také prokázáno, že produkuje serinovou proteázu Esp, která inhibuje a ničí biofilm tvořený bakterií *S. aureus*. *S. epidermidis* představuje nejčastější zdroj infekce přenesené zdravotnickými pomůckami (například katétrů), právě proto, že je trvalým a všudypřítomným kolonizátorem lidské kůže (Uckay *et al.*, 2009). Infekce způsobené *S. epidermidis* jsou velmi obtížně léčitelné, zejména kvůli tvorbě biofilmu a genům specifické rezistence k antibiotikům. Geny rezistence jsou shodné s geny *Staphylococcus aureus*, ale vyskytují se ve větší míře (Becker *et al.*, 2014).

Dalším zástupcem koaguláza-negativních stafylokoků izolovaných z ran je *Staphylococcus caprae*. Tento stafylokok byl původně izolován z kožní mikroflóry koz, ale bylo zjištěno, že se vyskytuje i v nosní dutině, na kůži nebo nehtech lidí. Může způsobovat komunitní nebo nozokomiální infekce jako například peritonitidu, močové infekce, pneumonie a je také spojen s infekcemi kloubů a kostí (Seng *et al.*, 2014). Původcem infekcí u člověka může být také *Staphylococcus saprophyticus*, *S. warneri* nebo *S. haemolyticus*.

1. 4. 2 Rod *Streptococcus*

V roce 2015 rod *Streptococcus* zahrnoval více než 100 uznaných druhů. Streptokoky jsou gram-pozitivní, nepohyblivé koky uspořádané nejčastěji do dvojic či řetízků, které na rozdíl od stafylokoků netvoří katalázu. Většina druhů je fakultativně anaerobních a konečným produktem zkvašování cukrů je kyselina mléčná. Streptokoky jsou komenzály sliznic lidí a zvířat. Jsou běžnou součástí mikroflóry kůže, dutiny ústní, nosní nebo trávicího traktu, což vysvětluje častou kontaminaci biologických vzorků. Přesná identifikace těchto bakterií je poměrně pracná. Jednotlivé druhy mají velmi rozmanité vlastnosti, proto jsou tříděny dle několika kritérií, jako například hemolytické reakce na krevním agaru nebo na základě stěnové antigenu. β -hemolytické druhy jsou někdy nazývány jako pyogenní a zahrnují zejména lidské patogeny jako *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* nebo *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Některé viridující streptokoky jako *Streptococcus pneumoniae* vyžadují pro svůj růst 5% CO₂ (Glazunova *et al.*, 2010; Spellerberg a Brandt, 2015).

1. 4. 2. 1 *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae je řazen mezi β -hemolytické streptokoky skupiny B. Na krevním agaru tvoří bílé, hladké, vypouklé kolonie obklopené zónou úplné hemolýzy. Tento druh může také osídlovat sliznice respiračního, zažívacího nebo ženského urogenitálního traktu, aniž by způsoboval onemocnění. Za život ohrožující je považováno nosičství u těhotných, které může být nebezpečné pro rodičku i novorozence. Je jednou z hlavních příčin pneumonie, meningitidy nebo septikémie u novorozenců. Velmi nebezpečný je také pro imunokompromitované a starší osoby. Může také delší dobu přežít v mléčné žláze a způsobit mastitidu (Tadesse a Alem, 2006; Richards *et al.*, 2011).

1. 4. 2. 2 *Streptococcus dysgalactiae*

Streptococcus dysgalactiae patří do skupiny β -hemolytických streptokoků a bývá řazen k antigenní skupině C nebo G. Často jsou u něj také identifikovány faktory virulence běžné pro skupinu A, jako například C5a peptidáza, M-protein, hyaluronidáza (Watanabe *et al.*, 2013). Na krevním agaru vyrůstá v drobných bílých koloniích s úplnou hemolýzou. *Streptococcus dysgalactiae* má dva poddruhy, subsp. *dysgalactiae* izolovaný zejména ze zvířecích vzorků a subsp. *equisimilis* (SDSE) z lidských izolátů. SDSE je součástí mikroflóry hltanu, kůže, gastrointestinálního nebo urogenitálního traktu člověka a dříve byl považován za nepatogenní (Jensen a Kilian, 2012; Iraz *et al.*, 2013). Je prokázáno, že způsobuje onemocnění jako streptokoky skupiny A, jako jsou faryngitidy, impetigo, nekrotizující fascitida nebo bakteriémie (Bramhachari *et al.*, 2010).

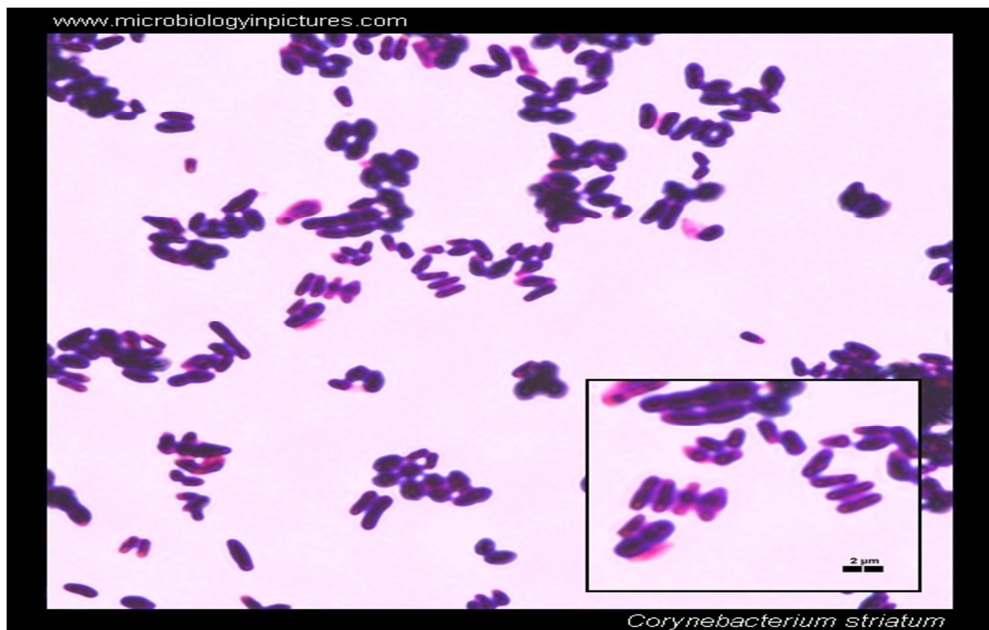
1. 4. 3 Rod *Corynebacterium*

Do tohoto rodu jsou primárně zařazovány gram-pozitivní kyjovité tyčky, ale z hlediska morfologie je to skupina velmi heterogenní. V literatuře se objevují také názvy koryneformní tyčky nebo difteroidy, které nesou název po nejznámějším zástupci *Corynebacterium diphtheriae* způsobujícím záškrť. Korynebakterie jsou tenké tyčky někdy zahnuté či kyjovité s nehomogenně se barvící cytoplasmou. Od jiných tyček se odlišují způsobem dělení. Původní buňka se prodlouží a po vytvoření septa se rozlomí na 2 dceřiné, které zůstávají částečně spojené a tak vzniká uspořádání tvaru V. Většina korynebakterií je nepohyblivých, netvoří spory, tvoří katalázu, netvoří oxidázu a jsou aerobní až fakultativně anaerobní (Funke a Bernard, 2011; Biswal *et al.*, 2014). Kromě nejznámějšího *Corynebacterium diphtheriae* jsou nově za klinicky významné považovány také *Cor. amycolatum*, *Cor. jeikeium* nebo *Cor. striatum*. Přestože je *Cor. striatum* jednou z nejčastěji izolovaných korynebakterií z klinického materiálu, nelze dokázat jeho spojení s vyvoláním infekce, protože se obvykle vyskytuje spolu s dalšími bakteriemi (Bernard, 2012).

1. 4. 3. 1 *Corynebacterium striatum*

Corynebacterium striatum bylo dříve považováno za saprofytický organismus osidlující kůži a sliznice. Ale v poslední době je řazen k multirezistentním patogenům, které způsobují infekce v dlouhodobě otevřených ranách. Jeho izolace z klinických vzorků by neměla být ignorována vzhledem k nebezpečí nozokomiálních infekcí (Superti *et al.*,

2009). Například Dowd *et al.* (2008b) ve studii zaměřené na diabetické vředy identifikovaly ve 30 vzorcích ze 40 bakterie rodu *Corynebacterium*. *Cor. striatum* nevyžaduje speciální půdy, na krevním agaru vyrůstá za 24 hodin při 37 °C v krémových nehemolytických koloniích. Tvoří katalázu, ale ne oxidázu. V preparátu jsou velmi často vidět gram-pozitivní tyčky se zaoblenými okraji uspořádané do tvaru V nebo palisád.



Obrázek 3 *Corynebacterium striatum* barvené dle Grama (<http://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-micrographs/gram-stain/gram-positive/corynebacterium-striatum-gram.jpg>, [cit. 7. 3. 2017])

1. 4. 4 Rod *Arcanobacterium*

Tento rod vznikl přejmenováním *Corynebacterium haemolyticum* na *Arcanobacterium haemolyticum*. Dalšími klinicky významnými zástupci byly *A. pyogenes* a *A. bernardiae*, ty jsou ale nově přejmenovány na *Trueperella pyogenes* a *Trueperella bernardiae* (Riberio *et al.*, 2015). *A. haemolyticum* je gram-pozitivní značně pleomorfní, nesporulující, fakultativně anaerobní, delší kyjovitá tyčinka. Na rozdíl od korynebakterií netvoří katalázu. Jejich identifikace je obtížná. V preparátu se podobají *Corynebacterium* sp., rostou pomalu a krevní agar hemolyzují obvykle až po 48 hodinách inkubace při 37 °C. Pro rozpoznání může sloužit produkce fosfolipázy, která inhibuje β -hemolýzu *Staphylococcus aureus* při tzv. reverzním CAMP testu (Miyamoto *et al.*, 2015; Parija *et al.*, 2005). *Arcanobacterium haemolyticum* je komenzálem na lidské kůži a sliznici horních cest dýchacích. Může způsobovat zánět hltanu nebo měkkých tkání jako jsou chronické vředy. Byly hlášeny také případy hluboké infekce jako je zánět vedlejších nosních dutin, endokarditida nebo

meningitida (Meyer a Reboli, 2005). Na rozdíl od korynebakterií ale zůstává *A. haemolyticum* citlivé na antibiotika, jako jsou β -laktamy, makrolidy, linkosamidy, fluorochinolony, vankomycin nebo tetracyklin. Rezistence byla zjištěna na kotrimoxazol (Malini *et al.*, 2008).

1. 4. 5 Rod *Pseudomonas*

Do rodu *Pseudomonas* jsou řazeny gram-negativní, aerobní, pohyblivé tyčinky, které nejsou kultivačně náročné. Všechny druhy tvoří katalázu i oxidázu. Rostou při teplotách od 4 do 42 °C a některé druhy jsou schopné tvořit pigmenty. Běžně se vyskytují v odpadních vodách, půdě nebo v trávicím traktu savců. Klinicky významným patogenem u chronických ran je *Pseudomonas aeruginosa* a pak další podmíněně patogenní druhy jako *Pseudomonas monteilii*, vyčleněná z druhu *Pseudomonas putida* (Tadesse a Alem, 2006; Vojtková *et al.*, 2015).

1. 4. 5. 1 *Pseudomonas aeruginosa*

Gramovým barvením ji nijak neodlišíme od ostatních gram-negativních tyčinek, je ale snadno rozpoznatelná dle růstu na základních půdách. Vytváří kovově lesklé kolonie, které bývají z části autolyzovány, na krevním agaru je obklopena zónou úplné hemolýzy. Roste při 30-37 °C nebo při pokojové teplotě. Vytváří modrozelený pigment pyocyanin a další pigmenty. Charakteristická je také její ovocná nebo jasmínová vůně. *Ps. aeruginosa* je oportunní patogen vyskytující se v půdě a ve vodách (Palleroni, 2015). Přizpůsobivost a vysoká antibiotická rezistence jí umožňují přežívat nejen v přírodě, ale také na umělých površích zejména ve zdravotnických zařízeních. *Ps. aeruginosa* je primárně nozokomiální patogen a téměř vždy napadá oslabené pacienty, například imunosuprimované, pacienty s rozsáhlými popáleninami nebo těžkými defekty, po těžkých operacích či s dlouhodobě zavedeným katétrem (Tadesse a Alem, 2006; Gellatly a Hancock, 2013).

1. 4. 6 Čeleď *Enterobacteriaceae*

Od roku 2016 patří čeleď *Enterobacteriaceae* stejně jako *Morganellaceae* do řádu *Enterobacteriales*. Tato čeleď zahrnuje gram-negativní, nesporulující, fakultativně anaerobní tyčinky (někdy kokobacily nebo i vlákna), většinou pohyblivé (Adeolu *et al.*, 2016). Tvoří katalázu, ale netvoří oxidázu. Většina je kultivačně nenáročná, mají respirační nebo fermentační metabolismus, při zpracování cukrů tvoří kyseliny a často i plyn. Enterobakterie

jsou rozšířeny po celém světě a často způsobují epidemická či endemická onemocnění. Některé podmíněně patogenní druhy, zejména ty zkvašující laktózu, jsou součástí mikroflóry trávicího traktu zvířat a lidí. V oblastech, kde lidé mají špatné nebo žádné hygienické návyky, se stávají zdrojem nákazy. Podmíněně patogenní enterobakterie jsou pak častým původcem nozokomiálních infekcí exogenního charakteru. Rody a druhy enterobakterií jsou rozlišovány na základě biochemických vlastností nebo pomocí MALDI-TOF MS. Často je nelze rozlišit podle DNA z důvodu vysoké příbuznosti (Tadesse a Alem, 2006; Janda a Abbott, 2015).

1. 4. 6. 1 Rody fermentující laktózu

Z chronických ran jsou nejčastěji izolované laktóza-pozitivní koliformní bakterie, ke kterým zařazujeme rody *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* a *Citrobacter*. Tyto rody se vyskytují i v gastrointerstinálním traktu lidí (Tadesse a Alem, 2006). Nejznámější *Escherichia coli* je primárně citlivá na všechna antibiotika, ale zejména nemocniční kmeny získávají sekundární (přenesenou) rezistenci. Rod *Klebsiella* zahrnuje nepohyblivé tyčinky většinou obalené výrazným polysacharidovým pouzdem. Z ranných infekcí bývá izolována *Klebsiella oxytoca* a stejně jako u ostatních podmíněně patogenních bakterií, i u klebsiel roste rezistence na antibiotika. Z rodu *Enterobacter* je významný zejména *Enterobacter cloacae* nebo *Enterobacter aerogenes*. Patogenní pro člověka jsou také *Citrobacter koseri* a *C. freundii*, které lze odlišit produkcí sulfanu, jež je pozitivní u *Citrobacter freundii* (Abbott, 2011).

1. 4. 7 Čeleď *Morganellaceae*

Do čeledi *Morganellaceae* řadíme např. rody *Proteus*, *Providencia* a *Morganella*, které můžeme izolovat z chronických ran (Adeolu *et al.*, 2016). Tato skupina se od ostatních enterobakterií odlišuje svojí schopností deaminace některých aminokyselin (fenylalanin a tryptofan) na ketokyseliny a amoniak. Pro rod *Proteus* je pak typický plazivý růst na tuhých kultivačních půdách. *Proteus mirabilis* nebo *Pr. vulgaris* jsou častými původci močových infekcí nebo sekundárních infekcí v ranách, například dekubitech. Odlišit je od sebe lze produkcí indolu, která je u *Pr. vulgaris* pozitivní (Tadesse a Alem, 2006). Rezistenci na antibiotika je nutno testovat, protože odolných kmenů stále přibývá. Do rodu *Morganella* patří nejznámější *Morganella morganii*, která stejně jako bakterie rodu *Providencia* neroste plazivě. Nejčastěji jsou z rodu *Providencia* izolovány *Providencia rettgeri* a *Prov. stuartii*.

Providencia rettgeri je častým původcem nozokomiálních infekcí a je vysoce rezistentní na antibiotika (Janda a Abbott, 2015).

1. 4. 8 Anaerobní bakterie

Společným znakem této skupiny bakterií je nepřítomnost systému cytochromoxidáz pro oxidační metabolismus a kyslík je tedy pro ně toxický. Anaerobní bakterie jsou komenzální i patogenní organismy. Jsou součástí mikroflóry dutiny ústní nebo třeba střevního traktu člověka. Endogenní anaeroby se mohou stát patogenními, pokud se dostanou do krve a způsobí bakteriémi. Oportunní patogeny způsobují infekci ran nebo střevní infekce při nenormálním složení střevní mikroflóry. K tomu dochází podáním antibiotik nebo při průjmech (Zambon a Haraszthy, 2015). Anaerobní mikroorganismy nejlépe rostou na komplexních médiích jako je TSA, Schaedler agar s krví nebo Brucella agar při 35-37 °C v anaerobní atmosféře s CO₂ (Tadesse a Alem, 2006).

1. 4. 8. 1 Rod *Bacteroides*

Do rodu *Bacteroides* jsou zahrnuty striktně anaerobní bakterie, které mají nejčastěji tvar tyčinek nebo vláken barvících se gram-negativně. Spolu s dalšími příbuznými rody osidlují sliznice horních cest dýchacích, gastrointestinálního traktu nebo vaginy. Ze stolice jsou izolovány ve větším množství než například *Escherichia coli*. Rozčlenění bakteroidů prochází v posledních letech změnami a byly vytvořeny nové rody jako například *Prevotella*. Nejčastějším anaerobním patogenem u člověka je *Bacteroides fragilis*. Z klinického materiálu pak bývá ještě izolovaný *Bacteroides thetaiotaomicron*. Oproti ostatním bakteroidům má *B. fragilis* důležitý faktor virulence, a to polysacharidové pouzdro (Zambon a Haraszthy, 2015; Snyderman *et al.*, 2007).

Vzrůstající odolnost anaerobních bakterií vůči antimikrobiálním látkám se stala celosvětovým problémem, proto bylo doporučeno pravidelné vyšetřování mechanismů rezistence (Hecht, 2004). Nejvíce odolný je zejména *Bacteroides fragilis*. Bakteroidy produkují β-laktamázy, jejichž působení lze účinně obejít použitím karbapenemů nebo kombinace β-laktamů s inhibítorem β-laktamáz, což potvrdili Fernández-Canigia *et al.* (2012) ve své studii. Znepokojení ale působí výskyt kmenů majících geny *cfiA*, zodpovědných za rezistenci ke karbapenemům. Z ostatních antibiotik se jako nejúčinnější ukázaly tigecyklin,

chloramfenikol nebo metronidazol. Byly ale již hlášeny ojedinělé případy rezistence právě na chloramfenikol nebo metronidazol (Snydman *et al.*, 2011).

1. 4. 8. 2 Rod *Peptostreptococcus*

Peptostreptokoky řadíme do skupiny gram-pozitivních anaerobních koků (GPAC), která neustále prochází taxonomickými změnami na základě analýz DNA (Murphy a Frick, 2013). Běžnou součástí mikroflóry dutiny ústní jsou *Peptostreptococcus anaerobius*, *Pep. stomatis* a *Pep. canis*. Klinicky nejvýznamnější je *Pep. anaerobius*, který je jedním z nejčastějších původců infekcí kůže, akutních a chronických ran nebo infekcí gastrointestinálního či ženského urogenitálního traktu. *Peptostreptococcus stomatis* byl izolován z ústní dutiny člověka a *Pep. canis* se vyskytuje u psů, kde mohou způsobovat záněty (Lawson *et al.*, 2012). Peptostreptokoky mají obvykle tvar kokobacilů a tvoří krátké řetízky. Na půdách pro anaeroby rostou většinou v šedých koloniích (Zambon a Haraszthy, 2015).

Könönen *et al.* (2007) studovali rezistenci peptostreptokoků na izolátech z vředů, kožních infekcí, hnisu z urogenitálních infekcí a dalších klinických vzorků. 13 % kmenů *Pep. anaerobius* bylo intermediálně citlivých na 1 či více antibiotik, včetně amoxicilinu, kombinaci amoxicilin/ kyselina klavulanová, cefoxitinu a moxifloxacinu. Metronidazol působí jako 1 z neúčinnějších antibiotik, ale zvyšuje se výskyt genů *nimB* zodpovědných za rezistenci *Pep. anaerobius* na metronidazol. Stejně jako ostatní GPAC jsou i peptostreptokoky rezistentní na tetracyklin a erythromycin (Brazier *et al.*, 2003).

1. 4. 8. 3 Rod *Finegoldia*

V roce 1999 byl *Peptostreptococcus magnus* zařazen do rodu *Finegoldia* jako *Finegoldia magna* (Murdoch a Shah, 1999). Tento rod tedy také patří do skupiny GPAC. V preparátu nalezneme gram-pozitivní koky ve shlucích, párech nebo krátkých řetízcích. Na půdách pro anaeroby rostou za 2-5 dnů nejčastěji v průhledných koloniích, ale mohou mít i bílou, šedou nebo žlutou barvu. V klinických vzorcích se nejčastěji vyskytuje spolu s dalšími GPAC, ale *F. magna* má schopnost tvořit biofilm. Nejvýznamnějšími a nejlépe prozkoumanými faktory virulence jsou protein L, PAB, suf A a FAF (Murphy a Frick, 2013).

Obecně lze říci, že *F. magna* je citlivá na antibiotika. Brazier *et al.* (2003) prokázali stejně jako u ostatních GPAC rezistenci k tetracyklinu a erythromycinu a navíc mírnou rezistenci ke klindamycinu, metronidazolu a penicilinu. Veloo *et al.* (2011) stanovili variabilní hodnoty odolnosti vůči fluorochinolonům a cefalosporinům. Oproti ostatním GPAC prokázali u *F. magna* vyšší odolnost vůči tigecyklinu nebo kombinaci amoxicilin/kyselina klavulanová.

1. 4. 8. 4 Rod *Peptoniphilus*

Rod *Peptoniphilus* je další, který patří ke skupině GPAC. Název pochází od peptonu, který je hlavním zdrojem energie. Neumí totiž fermentovat cukry a hlavním konečným produktem metabolismu je butyrát. Na půdách pro anaeroby roste v kulatých neprůhledných koloniích (Ezaki *et al.*, 2001). Klinicky významné jsou pouze *Peptoniphilus harei* a *Peptoniphilus ivorii*. Dowd *et al.* (2008a) zjistili, že *Peptoniphilus sp.* se vyskytuje ve 38,4 % vzorků z dekubitů, v 7 % diabetických vředů a pouze 0,2 % bérceových vředů. Brazier *et al.* (2003) prokázali, že *P. ivorii* je citlivý na všechna antibiotika, která testovali. Naproti tomu *Peptoniphilus harei* je rezistentní na tetracyklin, erythromycin i klindamycin, podobně jako ostatní GPAC.

1. 5 Biofilm

Kolonizace ve formě biofilmu jsou velmi problematické u chronických ran, protože prodlužují dobu léčení. Infekce nastává v závěrečné fázi, kdy bakterie překonají imunitní systém hostitele a napadnou hlubší vrstvy tkání, což vede k poškození. Přechod v infekci závisí na mnoha faktorech, např. na množství přítomných bakterií a jejich virulenci nebo na imunitním systému hostitele (Scali a Kunitomo, 2013).

Biofilmy jsou společenství bakterií ve vlastní extracelulární polysacharidové matrix, která zajišťuje stabilitu a ochranu buněk biofilmu. Ačkoliv jsou biofilmy mikroskopické struktury, klinicky mohou být detekovány, pokud jsou dostatečně velké. Byly popsány jako gelovité, lesklé a obtížněji odstranitelné struktury, odlišné od žlutých, neprůhledných strupů. Zralé biofilmy jsou vysoce odolné proti mnoha tradičním terapiím, v současné době je jednou z neúspěšnějších metod odstranění biofilmu débridement (Scali a Kunitomo, 2013). Vyčerpání živin a kyslíku v biofilmu totiž zastavuje růst bakterií a v tomto stavu jsou méně

náchylné k působení některých antibiotik. Biofilmová matrice poskytuje bakteriím ochranu proti imunitním buňkám a může také omezit pronikání antibiotik (Naber, 2009).

Podle Bowler *et al.* (2001) mikroorganismy v ráně pocházejí pravděpodobně ze tří hlavních zdrojů. Ze životního prostředí (exogenní mikroorganismy ze vzduchu, vody, půdy), z okolní kůže (běžná kožní mikroflóra jako *Staphylococcus epidermidis*, mikrokoky, *Propionibacterium* sp.) nebo z endogenních zdrojů (zahrnující sliznice gastrointestinálního, orofaryngeálního a urogenitálního traktu).

1. 6 Testování citlivosti na antibiotika

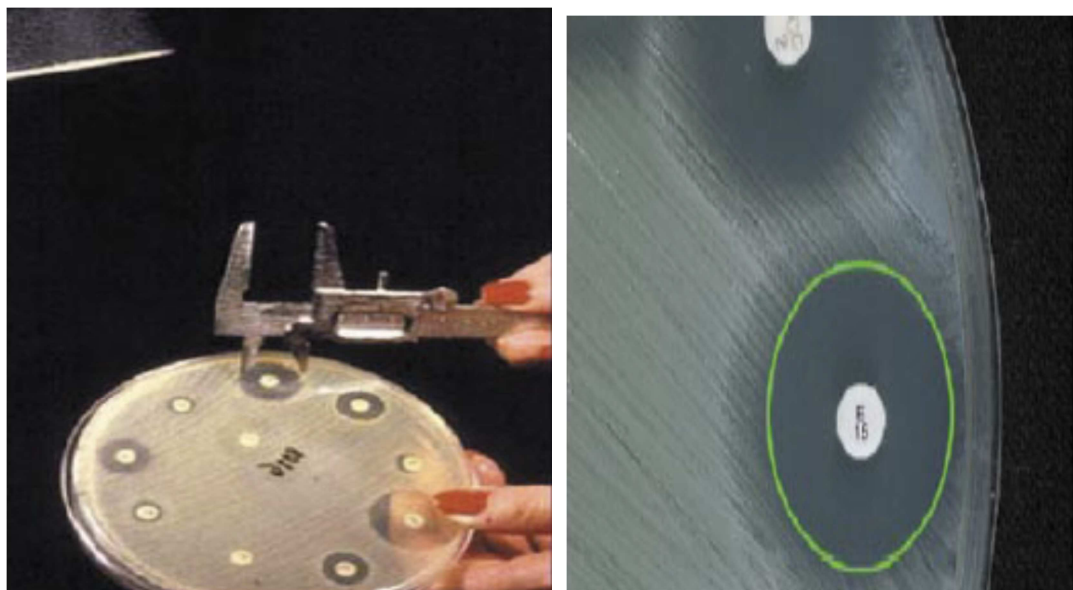
Testování citlivosti bakterií na antibiotika je nedílnou součástí práce laboratoří klinické mikrobiologie a podává výsledky nezbytné pro tzv. racionální antibiotickou terapii. Metody testování citlivosti můžeme rozdělit na kvalitativní a kvantitativní, jejichž postup a interpretace výsledků je řízena na základě konsensu mezinárodních organizací pro standardizaci (CLSI, EUCAST). Výsledkem kvalitativních metod je rozdělení mikroorganismů na citlivé, intermediální a rezistentní vůči testovaným antibiotikům. Kvantitativní metody určují míru rezistence nebo citlivosti, a to stanovením hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC). Dle principu jednotlivých metod je lze rozdělit na difúzní nebo diluční (Špaček *et al.*, 2013).

1. 5. 1 Disková difúzní metoda

Disková difúzní metoda je jednou z nejstarších metod pro vyšetřování citlivosti na antibiotika. Tato metoda zůstává jednou z nejpoužívanějších v rutinních klinických laboratořích. Základem je vytvoření bakteriální suspenze ve fyziologickém roztoku o koncentraci asi 0,5 McFarlandova zákalového standardu. Suspenze je následně rovnoměrně rozetřena tamponem po povrchu agaru, nejčastěji se používá Mueller-Hintonův agar. Na nanesené inokulum jsou umístěny komerčně dodávané papírové disky obsahující antibiotikum, které radiálně difunduje do agaru. Miska s agarem je inkubována 16-24 hodin při 35 ± 1 °C (EUCAST, 2017a).

Po kultivaci se ručně nebo digitálním zařízením změří průměr inhibičních zón okolo disku. Průměry zón se interpretují do kategorií citlivosti podle poslední verze tabulky

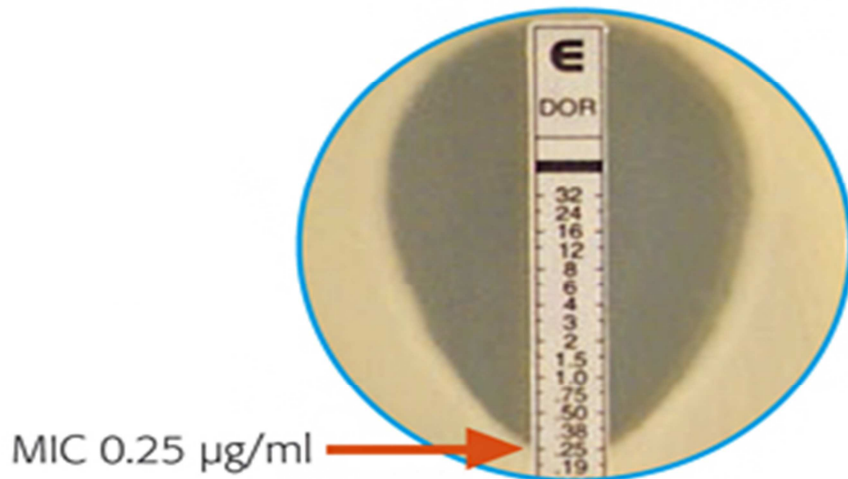
breakpointů (mezních hodnot) stanovených na stránkách EUCAST. Česká verze je dostupná na stránkách Státního zdravotního ústavu (SZÚ). Obecně platí, že čím větší průměr má inhibiční zóna, tím citlivější je mikroorganismus (Špaček *et al.*, 2013; EUCAST, 2017a).



Obrázek 4 Měření inhibičních zón- vlevo: manuálně; vpravo: digitálním zařízením (Ortez, 2005)

1. 5. 2 Gradientová difúzní metoda – E-test

E-test je modifikací diskové difúzní metody, která poskytuje kvantitativní výsledky ve formě hodnot MIC. Místo papírových disků se používají tenké plastové proužky, které jsou na spodní straně impregnované vysušeným antibiotikem s různými koncentracemi (koncentrační gradient). Na vrchní straně je pak uvedena koncentrační stupnice. Po inkubaci vzniká elipsoidní inhibiční zóna. V místě protnutí této zóny se stupnicí na proužku je odečtena hodnota MIC. E-test je finančně nákladný, proto nevhodný pro rutinní praxi (Špaček *et al.*, 2013; Parija, 2009).

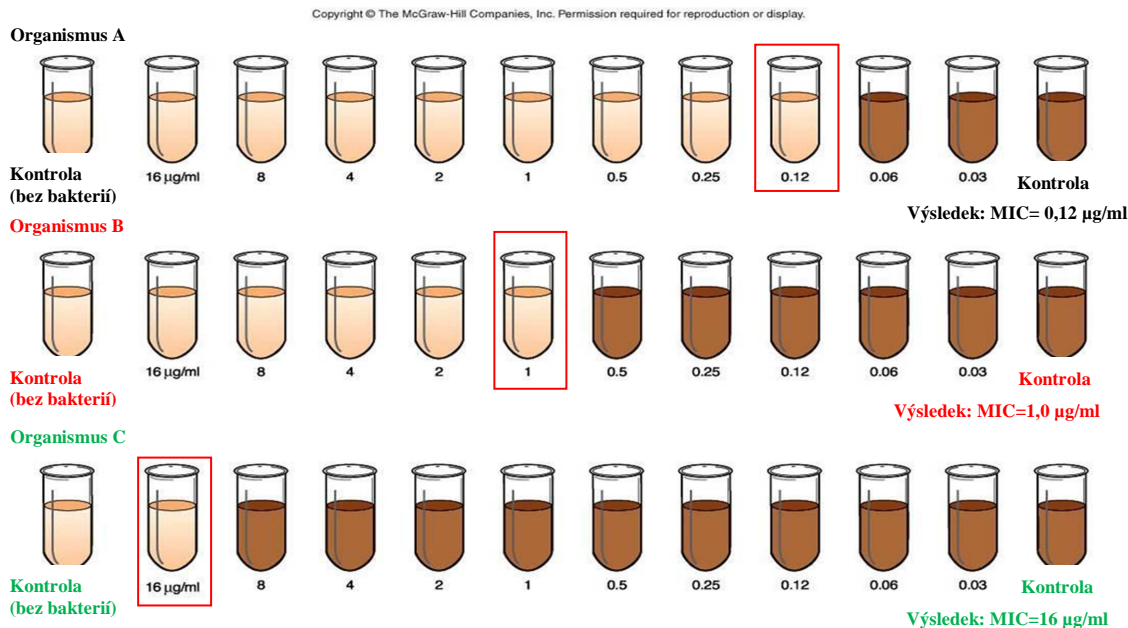


Obrázek 5 Odečítání hodnoty MIC u E-testu (<http://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/etest-mic-technique-b.jpg>, [cit. 8. 3. 2017])

1. 5. 3 Bujónová diluční metoda

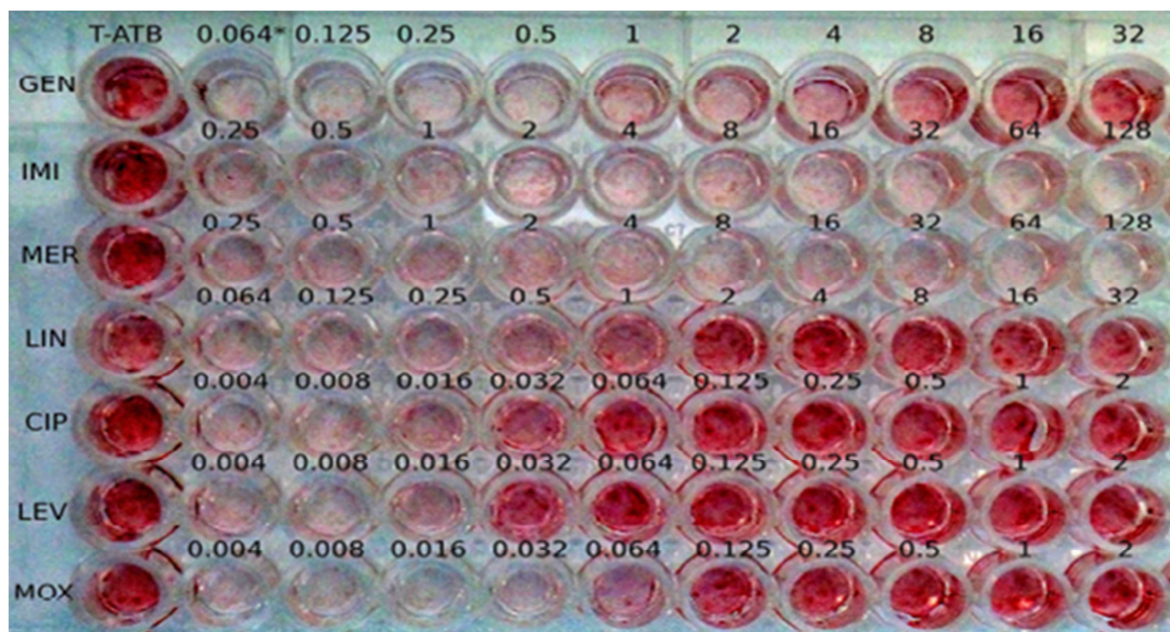
Jedná se o kvantitativní metodu sloužící k určování míry citlivosti či rezistence na základě hodnot MIC. Dříve byla tato metoda prováděna ve zkumavkách s kultivačním médiem a s různými koncentracemi antibiotik (obvykle dvojková ředící řada). Dnes je kvůli zdlouhavosti, náročné přípravě a vysoké spotřebě činidel nahrazena mikrotestem. Mikrotest se provádí většinou v 96 jamkové mikrotitrační destičce obsahující bujón s rovnoměrně klesající koncentrací antibiotik v každé jamce. Používá se standardní Mueller-Hintonův bujón nebo obohacený MHB s lyzovanou koňskou krví a β -NAD. Pro jedno antibiotikum se používá alespoň 8 různých koncentrací. Dále pak test obsahuje pozitivní a negativní kontrolu (Parija, 2009; EUCAST, 2017b).

Zkumavky nebo jamky destičky jsou inokulovány bakteriální suspenzí a inkubovány 24 hodin při 37 °C. Po ukončení kultivace se vizuálně nebo automatickým přístrojem odečte hodnota MIC, tedy nejnižší koncentrace antibiotika ve zkumavce či jamce zcela inhibující růst bakterií. Výhodou mikrodilučních metod je zejména nižší spotřeba činidel a snazší odečítání výsledků automatickým detektorem. Nevýhodou je omezené množství komerčně dodávaných kitů, které nemusí vyhovovat potřebám laboratoře (Parija, 2009; Rankin, 2005).



Obrázek 6 Zkumavková diluční metoda

(<https://classconnection.s3.amazonaws.com/151/flashcards/2859151/jpg/picture201315238780208-14549516A4C1946A23F.jpg>, [cit. 8. 3. 2017])



Obrázek 7 Mikrodiluční metoda (http://www.frontiersin.org/files/Articles/78873/fcimb-04-00036-HTML/image_m/fcimb-04-00036-g001.jpg, [cit. 8. 3. 2017])

1. 5. 4 Agarová diluční metoda

U agarové diluční metody jsou antibiotika přítomna v agaru a každá miska pak obsahuje jinou koncentraci antibiotika. Na povrch agaru můžeme inokulovat velké množství izolátů najednou. Po inkubaci je tedy zjišťována přítomnost či nepřítomnost bakterií. Hodnota MIC odpovídá agaru s nejnižší koncentrací antibiotika, kde je růst mikroorganismů zcela

inhibován. Tato metoda není využívána v rutinní praxi, zejména kvůli náročné přípravě agarů a jejich krátké životnosti (Rankin, 2005; Parija, 2009).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2. 1 Vyšetřovaný materiál

Vyšetřovaným materiálem byly stěry z různých druhů nehojících se ran. Vzorky byly získávány ve spolupráci s Mudr. Ondřejem Malým z Fakultní nemocnice v Hradci Králové (Poradna pro chronické rány).

2. 2 Přístroje a pomůcky

○ Přístroje

Bugbox anaerobní stanice (BAKER RUSKINN, Velká Británie), BACMED 6iG2 (ASPIAG s.r.o., ČR), světelný mikroskop BX41 (OLYMPUS, Japonsko), digitální váhy 440-43 (KERN, Německo), vodní lázeň Certomat WR (B. Braun Biotech International AG, Německo), plynový kahan, McFarland Densitometr DEN-1 (BIOSAN, EU), třepačka Bio Vortex V1 (BIOSAN, EU), termostat Lovibond (Tintometer group, Anglie), chladničky LIEBHERR Comfort. Sterilizace: Sterimat HS202A, BMT Medical Technology s.r.o., ČR; parní sterilizátor PS20A, Chirana, ČR; parní sterilizátor Sterilab, BMT Medical Technology s.r.o., ČR.

○ Chemikálie a pomůcky

Jednokanálové mikropipety 20-200 μ l, 100-1000 μ l, 1000-10000 μ l (HTL, Polsko), špičky 200 μ l, 1000 μ l, 10000 μ l (HTL, Polsko), jednorázové sterilní inokulační kličky 10 μ l (VWR, Itálie), plastové Petriho misky 9 cm, plastové zkumavky 15 ml (MEUS, Itálie), plastové sterilní pipety 3 ml (steriCLIN, VP Group), sterilní jehly (MEDOJECT), chladicí taška pro převoz biologických vzorků.

Skleněné lahve se šroubovacím uzávěrem 250 ml, 500 ml (Fischer Scientific, spol. s.r.o., ČR), odměrný válec 25 ml, 500 ml (SIMAX – Kavalierglass, a.s., ČR), Erlenmayerova baňky 250 ml, 500 ml (Fischer Scientific, spol. s.r.o., ČR), skleněné kádinky (SIMAX-Kavalierglass, a.s., ČR), skleněné zkumavky, stojany na zkumavky, kovové zátky, podložní sklíčka.

Transportní systém s výtěrovým tamponem a Amiesovým agarem s aktivním uhlím (COPAN, Itálie), MIKROLATEST: STAPHYtest 16 (č. š. 1508040), ENTEROtest 16 (č. š.

1605208), STREPTOtest 24 (č. š. 1505010), NEFERMtest 24 (č. š. 1604107) včetně činidel (Erba Lachema s.r.o., ČR), Schaedler agar- neselektivní půda pro anaeroby (Lab Media Servis s.r.o., ČR, č. š. 1603729), antibiotické disky (OXOID, Velká Británie), činidlo pro stanovení oxidázy (bioMérieux, Francie, č. š. 324785), peroxid vodíku 3%, 70% etanol. Roztoky pro Gramovo barvení: krystalová violet, Lugolův roztok a karbolfuchsin (HiMedia Laboratories, Indie), parafínový olej, imerzní olej.

2. 3 Příprava kultivačních médií a roztoků

2. 3. 1 Krevní agar (KA)

17 g Blood Agar Base No.2 (HiMedia Laboratories, č. š. 0000154609) bylo rozpuštěno ve 400 ml destilované vody. Blood Agar Base No.2 obsahuje pepton (15 g/l), játrový extrakt (2,5 g/l), kvasničný extrakt (5 g/l), chlorid sodný (5 g/l) a agar (15 g/l). Agarový základ byl sterilizován v parním sterilizátoru po dobu 1,5 hodiny. Teplota sterilizačního procesu je 121 °C. Po vychladnutí přibližně na teplotu 55-60 °C bylo přidáno 20 ml defibrinované beraní krve. Připravená agarová půda byla rozlita do plastových Petriho misek. Po vychladnutí byly půdy skladovány v chladničce při teplotě 4 °C maximálně 3 týdny.

2. 3. 2 Xylóza-lysin-deoxycholátový agar (XLD)

10,6 g X. L. D. MEDIUM (OXOID, č. š. 1056982) bylo rozpuštěno ve 200 ml destilované vody. Toto médium obsahuje kvasničný extrakt (3 g/l), L-lysin HCl (5 g/l), xylózu (3,75 g/l), laktózu (7,5 g/l), sacharózu (7,5 g/l), deoxycholát sodný (1 g/l), chlorid sodný (5 g/l), thiosíran sodný (6,8 g/l), citrát amonno-železitý (0,8 g/l), fenolová červeň (0,08 g/l) a agar (12,5 g/l). Agarový základ byl sterilizován při teplotě 100 °C ve vodní lázni po dobu 20 minut. Po vychladnutí na teplotu 55-60 °C byla připravená půda rozlita do plastových Petriho misek. Půdy byly skladovány v chladničce při 4 °C maximálně 3 týdny.

2. 3. 3 Brucellový bujón

2,81 g Brucella Broth Base (HiMedia Laboratories, č. š. 0000052061) bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Brucella Broth Base obsahuje enzymový hydrolyzát kaseinu (10 g/l), pepticky štěpenou zvířecí tkáň (10 g/l), kvasničný extrakt (2 g/l), dextrózu (1 g/l), chlorid sodný (5 g/l), bisulfit sodný (0,1 g/l). Bujónový základ by sterilizován v parním sterilizátoru po dobu 1,5 hodiny. Teplota sterilizačního procesu je 121 °C. Po vychladnutí

na laboratorní teplotu byl bujón rozpipetován do plastových zkumavek. Ve zkumavkách s pootevřeným uzávěrem byl následně 10 minut povařen ve vodní lázni. Po vyjmutí byly zkumavky přeneseny do anaerobního boxu. V anaerobním boxu byly zkumavky ponechány s povoleným uzávěrem, aby došlo k výměně plynů a uchovávány při 37 °C.

2. 3. 4 Fyziologický roztok

4,25 g Chloridu sodného (Lach-Ner s.r.o., č. š. 051212) bylo rozpuštěno v 500 ml destilované vody. Skleněná lahev s povoleným uzávěrem byla sterilizována v parním sterilizátoru po dobu 1,5 hodiny. Teplota sterilizačního procesu je 121 °C. Po vychladnutí byl fyziologický roztok skladován v chladničce při 4 °C.

2. 4. Identifikace mikroorganismů

Stěry od pacientů z Fakultní nemocnice v Hradci Králové byly ihned po odběru v chaldíci tašce převezeny do laboratoře. Poté byly očkované na Schaedlerův agar v anaerobním boxu, kde byly také inkubovány 24 hodin při 37 °C v anaerobní atmosféře s 5,1 % vodíku, 10 % CO₂ a dusíkem. Zároveň byly také očkované na KA a XLD agar a kultivovány za aerobních podmínek v termostatu 24 hodin při 37 °C. Po inkubaci byly jednotlivé kolonie v anaerobním boxu izolovány na Schaedler agar a KA. KA byl dále kultivován za aerobních podmínek. Kolonie vyrostlé na KA a XLD agaru za aerobních podmínek byly dále izolovány na KA a opět inkubovány 24 hodin při 37 °C v termostatu.

U takto izolovaných aerobních mikroorganismů byla dále stanovena kataláza a oxidáza a byl vytvořen preparát obarvený dle Grama. Na základě vzhledu preparátu a výsledků testů katalázy a oxidázy byly provedeny biochemické testy. Po odečtení barevných změn byly výsledky vyhodnoceny počítačovým programem. V případě nesprávného vyhodnocení nebo nízké shody byly mikroorganismy spolu s anaerobními bakteriemi identifikovány pomocí MALDI-TOF MS na Oddělení klinické mikrobiologie (Pardubické Nemocnice) nebo ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství (Brno).

2. 5 Testování citlivosti na antibiotika u anaerobních organismů

Kmeny *Peptoniphilus harei*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Fingoldia magna* a *Eubacterium limosum* získané z chronických ran byly nejprve pomnoženy v Brucellovém

bujónu. Kultivace probíhala v anaerobním boxu při 37 °C po dobu 24-48 hodin. Po pomnožení bylo 1-2 ml bujónu odebráno plastovou pipetou a poté nalito na Schaedlerův agar. Po rovnoměrném rozlití byla většina tekutiny zpětně odsáta. Po zaschnutí byly sterilní jehlou aplikovány jednotlivé antibiotické disky pro základní stanovení citlivosti anaerobů (viz Tabulka 1). Misky byly kultivovány v anaerobním boxu 48 hodin při 37 °C. Po inkubaci byly velikosti zón inhibice odečteny na přístroji BACMED 6iG2, který také orientačně vypočítává MIC.

Tabulka 1 Antibiotické disky pro základní testování citlivosti anaer. mikroorganismů

Název antibiotika	Antibiotická značka	Koncentrace
Penicilin G	P	10 UNITS
Amoxicilin/kys. klavulanová	AMC	20 µg + 10 µg
Klindamycin	DA	2 µg
Doxycyklin	DO	30 µg
Metronidazol	MTZ	5 µg
Vankomycin	VA	5 µg

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3. 1 Identifikované mikroorganismy

Celkem bylo zpracováno přes 130 vzorků od 61 pacientů. Výsledky identifikace byly doplněny Mudr. Ondřejem Malým o etiologii rány a další údaje. Na základě těchto údajů jsem vytvořila konečnou tabulku s rozdělením ran dle etiologie a nejčastěji izolovaných organismů.

Tabulka 2 Etiologie rány a nejčastější mikroorganismy

Etiologie rány	Počet	Nejčastější mikroorganismy	Anaerobní bakterie
Chronická žilní insuficience	42	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Streptococcus dysgalactiae</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Proteus sp.</i> ; <i>Enterobacter cloacea</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Providencia stuartii</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (2x); <i>Bacteroides fragilis</i> ; <i>Helcococcus kunzii</i> ; <i>Eubacterium limosum</i>
Dekubitus	6	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ; <i>Proteus sp.</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Corynebacterium sp.</i> ; <i>Providencia stuartii</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (2x); <i>Bacteroides fragilis</i> (2x)
Ischemická choroba dolních končetin	5	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Corynebacterium striatum</i> ; <i>Proteus sp.</i> ; <i>Streptococcus sp.</i> ; <i>Klebsiella oxytoca</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i>	Bez nálezu

Tabulka 3 Etiologie rány a nejčastější mikroorganismy - pokračování

Etiologie rány	Počet	Nejčastější mikroorganismy	Anaerobní bakterie
Jiná	5	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Staphylococcus caprae</i> ; <i>Proteus</i> sp.; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Corynebacterium striatum</i>	<i>Fingoldia magna</i> ; <i>Bacteroides fragilis</i> ; <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ; <i>Peptoniphilus harei</i>
Syndrom diabetické nohy	2	<i>Streptococcus</i> sp.; <i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Serratia marcescens</i> <i>Corynebacterium striatum</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Staphylococcus caprae</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
Lymfedém	1	<i>Proteus</i> sp.; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Corynebacterium striatum</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Bez nálezu

Při porovnání s ostatními studii, jsme zjistili nižší výskyt anaerobních bakterií v ranách. Bylo prokázáno, že stěry z chronických ran nejsou dostačující pro záchyt anaerobů, proto mohou být naše výsledky falešně negativní. Stryja (2017) uvádí, že pro identifikaci mikroorganismů v ranách je vhodné používat biopsii tkáně nebo kyretáž spodiny rány. Pro pacienta jsou tyto metody invazivní a náročné a provádí se v celkové anestezii. Proto se biopsie pro identifikaci mikroorganismů v ranách používá jen velmi zřídka.

Chronická žilní insuficience bývá hlavní příčinou vzniku žilních bérčových vředů. Scali a Kunimoto (2013) ve své studii uvádí nejčastější mikroorganismy přítomné v bérčových vředech *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, koaguláza-negativní stafylokoky nebo *Proteus* sp. Z anaerobů se vyskytují například *Fingoldia magna*, *Peptostreptococcus anaerobius* nebo *Helcococcus kunzii*. Dowd *et al.* (2008a) prokázal také vysoký výskyt fakultativně anaerobních gram-negativních tyčinek, jako jsou *Escherichia* sp., *Serratia* sp. nebo *Enterobacter* sp. V porovnání

se studii Scali a Kunimoto (2013) a Dowd *et al.* (2008a) jsme často také izolovali kmeny *Klebsiella oxytoca*, *Providencia stuartii*, nebo *Morganella morganii*. Studie Dowd *et al.* (2008a) uvádí, že v porovnání s ostatním typem ran se anaerobní bakterie v bérkových vředech vyskytují méně často. V naší studii jsme z bérkových vředů vyizolovali například *Peptostreptococcus anaerobius*, *Bacteroides fragilis* nebo *Helcococcus kunzii*.

Dowd *et al.* (2008a) zjistili, že až 62 % bakterií izolovaných z dekubitů jsou striktně anaerobní organismy, jako například *Peptostreptococcus* sp., *Peptoniphilus* sp. nebo *Finogoldia* sp. Vyšší výskyt anaerobních bakterií potvrzují i naše výsledky. Z 6 pacientů s dekubity se u 3 vyskytovala anaerobní bakterie, u jednoho pacienta dokonce 2 najednou. Stejně jako v ostatních ranách se pak vyskytují *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., nebo koliformní bakterie (Bowler *et al.*, 2001).

Tiwari *et al.* (2012) ve své studii analyzovali celkem 49 pacientů s infikovanými diabetickými vředy. Nejčastěji izolovanými bakteriemi byly *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* sp., *Proteus* sp., *Citrobacter* sp. nebo *Klebsiella* sp. Mezi našimi vzorky byly pouze 2 případy syndromu diabetické nohy, u kterých jsme izolovali například streptokoky, stafylokoky, *Citrobacter* sp. nebo *Corynebacterium striatum*.

Dowd *et al.* (2008b) uvádí, že *Corynebacterium* sp. je nejčastěji izolovaným organismem u diabetických vředů. Je možné, že jeho vyšší výskyt u diabetických vředů souvisí s cukrovkou. Ze všech pacientů, od kterých jsme analyzovaly vzorky, mělo 12 diabetes mellitus. U 4 z nich jsme identifikovali *Corynebacterium striatum*. Z anaerobních bakterií se v diabetických vředech vyskytují *Peptoniphilus* sp., *Bacteroides* sp., *Finogoldia* sp. nebo *Peptostreptococcus* sp. (Dowd *et al.*, 2008b). My jsme pouze u jednoho pacienta izolovali *Peptostreptococcus anaerobius*.

Zajímavé je, že kromě jednoho případu se anaerobní bakterie vyskytovaly vždy v přítomnosti bakterie *Proteus* sp. Souvisí to zřejmě s provedením débridementu. U většiny ran se po čase velikost defektu zmenšila a současně se snížil počet bakterií v ráně. Velikost rány je prokazatelně ovlivněna druhy bakterií v ní přítomných. *Proteus* sp. nebo vyšší přítomnost koliformních bakterií zpomaluje zmenšování rány nebo dokonce ránu zvětšuje.

Krycí materiál je u každého pacienta vybírán podle mnoha kritérií, jako například podle vzhledu a velikosti rány nebo síly exsudace. U ran, které jsou infikované několika různými kmeny, se nejčastěji používají čistící gely v kombinaci se savým krycím materiálem. Můžeme aplikovat hydrogely, které pouze podporují autolytický débridement a vytváří vlhké prostředí v ráně (IntraSite gel, DebriEcaSan aquagel) nebo gely s antimikrobiálními látkami. K čištění rány a odstranění biofilmu z rány slouží například Prontosan® wound gel X s obsahem PHMB (Jones *et al.*, 2006; Smith, 2013). Na gel se pak přikládají různě savé krycí materiály nejčastěji s obsahem stříbra (Silvercel™ Non-Adherent, ACTICOAT◇ Flex 3, Biatain® Ag), jódu (INADINE*) nebo aktivního uhlí (ACTISORB®).

U pacientů s dekubity v oblasti hýždí byl v naší studii velmi často používán Silvercel™ Non-Adherent, který se vyznačuje pomalým uvolňováním stříbra. Většinou se ještě překrývá pěnovým materiálem, například Askina® DresSil nebo ALLEVYN◇ Gentle Border (Clark a Bradbury, 2010).

Nejmenší účinky vykazoval krycí materiál Hcel® HT obsahující kyselou formu karboxymethylcelulózy, která vytváří v ráně kyselé pH vhodné pro hojení (Hcel produktová informace, Dostupné z: <http://www.holzbecher.net/upload/ke-stazeni/hcel-produktova-informace-1.2.2014.pdf>, [cit. 27. 4. 2017]). Během léčby trvající od 2 do 9 měsíců u pacientů nedošlo ke zhojení rány, zejména pokud byly v ráně přítomné anaerobní bakterie. Tento materiál je podle výrobce vhodný i pro infikované rány, ale inhibuje růst pouze určitých druhů bakterií.

I přesto, že jsou vyvíjeny nové a účinnější materiály pro léčbu ranných infekcí, hojení chronických ran trvá dlouho a v některých případech je nakonec nutná amputace. Problémy působí zejména multirezistentní bakterie, které přetrvávají v ranách i přes působení stříbra nebo jódu. V naší studii jsme zjistili, že i když se rána hojí a její velikost se zmenšuje bakterie jako *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. nebo *Pseudomonas aeruginosa* přetrvávají v ráně až do úplného zhojení. Anaerobní bakterie jako *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptoniphilus harei* a *Bacteroides fragilis* jsou schopné přežít i ve velmi malých téměř zhojených ranách. Většinu anaerobních kmenů jsme identifikovali v ranách o velikosti 0,5 – 7 cm².

3. 2 Citlivost anaerobních bakterií na antibiotika

Při testování citlivosti anaerobních bakterií na antibiotika jsme postupovali dle doporučení primářky MUDr. Jany Janečkové z Oddělení klinické mikrobiologie Litomyšlské Nemocnice. Hodnocení diskové difúzní metody citlivý (S), intermediální (I) nebo rezistentní (R) kmen je stanoveno na základě hraničních hodnot stanovených CLSI a EUCAST (EUCAST, 2017c).

Postup stanovení dle metodiky EUCAST jsme kvůli laboratorním podmínkám byli nuceni upravit. Místo standardního Mueller-Hintonova agaru s NAD, na kterém anaeroby velmi špatně rostou, jsme použili neselektivní Schaedler agar pro anaeroby. Kvůli prostoru není možné v anaerobním boxu připravit zákal ve fyziologickém roztoku o hodnotě 0,5 McFarlandovy stupnice, proto jsme použili přímo bujón s pomnoženými kmeny o přibližné hustotě zákalu 0,5 McFarlanda.

3. 2. 1 Stanovení citlivosti u *Peptostreptococcus anaerobius*

Tabulka 4 Citlivost *Peptostreptococcus anaerobius* 1 na vybraná antibiotika

<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> 1				
	Zóna [mm]	Hraniční hodnoty [mm]	Orientační MIC	Výsledek
P	40,29	20-24	0,015	S
AMC	39,52	20-24	0,272	S
DA	24,91	14-15	0,002	S
DO	30,31	18-22	0,225	S
MTZ	42,66	16-21	0,05	S
VA	17,64	14-17	0,865	S

Tabulka 5 Citlivost *Peptostreptococcus anaerobius 2* na vybraná antibiotika

<i>Peptostreptococcus anaerobius 2</i>				
	Zóna [mm]	Hraniční hodnoty [mm]	Orientační MIC	Výsledek
P	40,29	20-24	0,015	S
AMC	41,9	20-24	0,18	S
DA	25,94	14-15	0,001	S
DO	37,05	18-22	0,022	S
MTZ	33,54	16-21	0,176	S
VA	17,64	14-17	0,865	S

Tabulka 6 Citlivost *Peptostreptococcus anaerobius 3* na vybraná antibiotika

<i>Peptostreptococcus anaerobius 3</i>				
	Zóna [mm]	Hraniční hodnoty [mm]	Orientační MIC	Výsledek
P	42,66	20-24	0,01	S
AMC	33,54	20-24	0,768	S
DA	26,73	14-15	0,001	S
DO	28,55	18-22	0,412	S
MTZ	28,55	16-21	0,351	S
VA	28,55	14-17	0,069	S

Peptostreptococcus anaerobius byl na všechna vybraná antibiotika citlivý. *Pep. anaerobius* z Oddělení klinické mikrobiologie Litomyšlské Nemocnice byl na penicilin, doxycyklin a vankomycin pouze intermediálně citlivý. U tohoto peptostreptokoka, ale nelze dohledat, z jakého pochází biologického materiálu. Raja (2007) ve studii provedené u pacientů s diabetickými vředy izoloval celkem 5 anaerobů, včetně *Peptostreptococcus* sp. Diskovou difúzní metodou testování citlivosti dokázal, že metronidazol a klindamycin byly účinné proti všem těmto anaerobům. V naší studii jsme také prokázali citlivost *Peptostreptococcus anaerobius* na metronidazol a klindamycin.

3. 2. 2 Stanovení citlivosti u *Peptoniphilus harei*

Tabulka 7 Citlivost *Peptoniphilus harei* 1 na vybraná antibiotika

<i>Peptoniphilus harei</i> 1				
	Zóna [mm]	Hraniční hodnoty [mm]	Orientační MIC	Výsledek
P	29,45	20-24	0,097	S
AMC	33,54	20-24	0,768	S
DA	21,09	14-15	0,029	S
DO	27,46	18-22	0,603	S
MTZ	26,7	16-21	0,454	S
VA	21,09	14-17	0,39	S

Tabulka 8 Citlivost *Peptoniphilus harei* 2 na vybraná antibiotika

<i>Peptoniphilus harei</i> 2				
	Zóna [mm]	Hraniční hodnoty [mm]	Orientační MIC	Výsledek
P	31,07	20-24	0,073	S
AMC	27,46	20-24	2,204	S
DA	24,91	14-15	0,002	S
DO	19,45	18-22	9,714	I
MTZ	26,73	16-21	0,451	S
VA	19,45	14-17	0,566	S

Tabulka 9 Citlivost *Peptoniphilus harei* 3 na vybraná antibiotika

<i>Peptoniphilus harei</i> 3				
	Zóna [mm]	Hraniční hodnoty [mm]	Orientační MIC	Výsledek
P	31,06	20-24	0,037	S
AMC	33,54	20-24	0,768	S
DA	27,46	14-15	0,001	S
DO	31,92	18-22	0,129	S
MTZ	33,54	16-21	0,176	S
VA	22,71	14-17	0,268	S

Peptoniphilus harei se ukázal být dobře citlivý na všechna testovaná antibiotika, ale v jednom případě byl pouze intermediálně citlivý na doxycyklin. *Peptoniphilus harei* dodaný z Litomyšlské Nemocnice byl dokonce rezistentní k doxycyklinu. Opět nelze zjistit původ daného kmene. Rezistenci *Peptoniphilus* sp. na doxycyklin by bylo vhodné dále sledovat.

3. 2. 3 Stanovení citlivosti u *Finegoldia magna*

Tabulka 10 Citlivost *Finegoldia magna* na vybraná antibiotika

<i>Finegoldia magna</i>				
	Zóna [mm]	Hraniční hodnoty [mm]	Orientační MIC	Výsledek
P	31,07	20-24	0,073	S
AMC	31,07	20-24	1,173	S
DA	18,72	14-15	0,152	S
DO	30,31	18-22	0,225	S
MTZ	37,91	16-21	0,096	S
VA	21,27	14-17	0,374	S

Finegoldia magna se také ukázala být velmi dobře citlivá ke všem testovaným antibiotikům.

Citlivost na antibiotika nebylo možné určit u izolovaných kmenů *Bacteroides fragilis*, protože po dlouhodobém přeočkovávání uhynuly. U *Eubacterium limosum* byla disková difúzní metoda provedena, ale výsledky nebyly vyhodnoceny, kvůli chybějícím hraničním hodnotám a také kvůli povlaku vytvořenému na agaru.

Diskovou difúzní metodu testování citlivosti na antibiotika jsme zvolili na doporučení paní primářky MUDr. Jany Janečkové, která ji využívá na svém oddělení. Dle dostupné literatury a CLSI, ale tato metoda není vhodná pro stanovení citlivosti anaerobů. Výsledky nejsou dostatečně srovnatelné s výsledky metody E-testu nebo agarové diluční metody (CLSI, 2013). My jsme tuto metodu prováděli poprvé a spíše pro ověření. Výborná citlivost anaerobů izolovaných z ran ukazuje, že tyto bakterie nejsou zřejmě hlavní příčinou problematického hojení chronických ran. Rány s anaeroby jsou vždy polymikrobiální. Bylo by například vhodné ověřit účinnost jednotlivých krycích materiálů na tyto bakterie.

Nicméně kmeny *Peptostreptococcus* sp., *Bacteroides* sp., *Peptoniphilus* sp. nebo *Finogoldia* sp. izolované z různých druhů vzorků, vykazují rezistenci například na klindamycin, metronidazol nebo amoxicilin s kyselinou klavulanovou. Geny rezistence se nejčastěji vyskytují na plazmidech a snadno tedy dochází k jejich přenosu. Časem by mohlo dojít k výskytu rezistentních kmenů i v ranách. U GPAC jsou často identifikovány geny *erm* způsobující odolnost vůči erythromycinu nebo geny *tet* zodpovědné za rezistenci na tetracyklin (Bartha *et al.*, 2011). U *Peptoniphilus harei* jsme v jednom případě zjistili intermediální citlivost na doxycylin, který je ze skupiny tetracyklinů.

Metronidazol lze považovat za jedno z neúčinnějších antibiotik. Znepokojení ale působí geny *nim B*, které jsou zodpovědné za rezistenci k metronidazolu. Theron *et al.* (2004) zjistili u 31 % *Pep. anaerobius* přítomnost těchto genů. Geny *nim* kódují reduktázy schopné redukovat 4- nebo 5-nitroimidazol na neúčinný 4- nebo 5-aminoimidazol (Sóki *et al.*, 2006). U *Finogoldia magna* byl tento gen objeven i u kmenů citlivých na metronidazol, mohlo by se tedy jednat o tichý gen (Theron *et al.*, 2004). V dalších studiích zaměřených na anaerobní mikroorganismy v chronických ranách by bylo vhodné sledovat tyto geny pomocí molekulárně biologických metod.

ZÁVĚR

Během této práce bylo analyzováno přes 130 vzorků stěrů od 61 pacientů s chronickými ranami. Vzorky byly získávány ve spolupráci s Mudr. Ondřejem Malým z Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Prováděna byla aerobní a anaerobní kultivace. Pro aerobní kultivaci byly použity krevní agary a XLD agary. Anaerobní bakterie byly očkované na neselektivní Schaedler agar pro anaeroby a inkubovány v anaerobní stanici při 37 °C 24-48 hodin. Po izolaci jednotlivých kolonií byla u aerobních kmenů provedena identifikace pomocí biochemických testů. Anaerobní a aerobní organismy, které nebylo možné identifikovat v laboratoři, byly určeny pomocí MALDI-TOF MS.

Hlavní příčinou vzniku ran je chronická žilní insuficience, kterou trpí 42 z 61 sledovaných pacientů. Spektrum bakterií se u různých druhů ran příliš neliší. Nejčastěji jsou z ran izolovány běžně se vyskytující bakterie jako *Staphylococcus aureus* a koaguláza-negativní stafylokoky, *Streptococcus* sp.; *Pseudomonas aeruginosa*; koliformní bakterie. Ze střevních bakterií to byly hlavně *Proteus* sp., *Providencia* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* nebo *Enterobacter cloacae*. Poměrně často byly také izolovány *Arcanobacterium haemolyticum* nebo *Corynebacterium* sp. Korynebakterie se častěji vyskytují u pacientů s diabetem. Anaerobní bakterie jsme izolovali ze vzorků pouze málo, protože stěry z ran nejsou pro jejich zachycení vhodným materiálem. Izolovali jsme například *Peptostreptococcus anaerobius*, *Bacteroides fragilis*, *Peptoniphilus harei* nebo *Fingoldia magna*. Anaerobní bakterie se vyskytovaly v ranách spolu s *Proteus* sp. a častěji se nachází u pacientů s dekubity nebo syndromem diabetické nohy, záleží tedy na správně provedeném débridementu.

U anaerobů byla také testována citlivost na antibiotika pomocí diskové difúzní metody, která byla vyhodnocena dle hodnot stanovených CLSI. Diskovou difúzní metodu testování citlivosti na antibiotika jsme u anaerobů zkoušeli poprvé. Výsledky měli sloužit hlavně pro ověření jejich citlivosti. Byla potvrzena dobrá citlivost všech kmenů na testovaná antibiotika. Pouze v jednom případě se u *Peptoniphilus harei* vyskytla intermediální citlivost na doxycyklin. Bohužel k této metodě neexistují stejné studie, protože dle CLSI není disková difúzní metoda vhodná pro testování u anaerobních bakterií. Častěji se provádí metoda E-test nebo agarová diluční metoda.

Vzrůstající rezistence na antibiotika není problémem pouze u aerobních a fakultativně anaerobních bakterií, jako jsou *Staphylococcus aureus* nebo *Pseudomonas aeruginosa*. Molekulárně biologickými metodami jsou stále častěji identifikovány geny zodpovědné za rezistenci k antibiotikům u anaerobních bakterií. Tyto geny se mohou mezi bakteriemi snadno přenášet, velmi často jsou totiž přítomné na plazmidech. Kromě sledování citlivosti bakterií na antibiotika, by bylo vhodné ověřit účinnost krycích materiálů přímo na kmeny anaerobních bakterií.

POUŽITÁ LITERATURA

1. ABBOTT, S. L. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas* and other *Enterobacteriaceae*. Chapter 37 in: VERSALOVIC, J.; ET AL., editor. *Manual of clinical microbiology*. American society for microbiology press, Washington DC, USA, 2011, 10. vydání, 2630s., ISBN 9781555816728
2. ABDELRAHMAN, T.; NEWTON, H. Wound dressings: principles and practice. *SURGERY*. 2011, vol. 29, issue 10, 491-495
3. ADEOLU, M.; ALNAJAR. S.; NAUSHAD, S.; GUPTA, S. R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacteriales ord. nov. divided into families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam nov., and *Budviciaceae* fam nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 2016, 66 (12), 5575-5599
4. AGRANOFF, D.; KRISCHNA, S. Metal ion homeostasis and intracellular paratism. *MOLECULAR MICROBIOLOGY*. 1998, 28 (3), 403-412
5. AGREN, M. S.; OSTENFELD, U.; KALLEHAVE, F.; GONG, Y.; RAFFN, K.; CRAWFORD, M. E.; KISS, K.; FRISS-MØLLER, A.; GLUUT, C.; JORGENSEN, L. N. A randomized double-blind, placebo-controlled multicenter trial evaluating topical zinc oxide for acute open wounds following pilonidal disease excision. *WOUND REPAIR AND REGENERATION*. 2006, vol. 14, issue 5, 526-535
6. AKIYAMA, H.; OONO, T.; SAITO, M.; IWATSUKI, K. Assessment of cadexomer iodine against *Staphylococcus aureus* biofilm in vivo and in vitro using confocal scanning microscopy. *JOURNAL OF DERMATOLOGY*. 2004, 31 (7), 529-534
7. BARTHA, N. A.; SÓKI, J.; URBÁN, E.; NAGY, E. Investigation of the prevalence of *tetQ*, *tetX* and *tetXI* genes in *Bacteroides* strains with elevated tigecycline

- minimum inhibitory concentration. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS*. 2011, vol. 38, 522-525
8. BECKER, K.; HEILMANN, CH.; PETERS, G. Coagulase-negative Staphylococci. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*. 2014, vol. 27, no. 4, 870-891
 9. BERNARD, K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 2012, vol. 50, no. 10, 3152-3158
 10. BIEN, J; SOKOLOVA, O.; BOZKO, P. Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: Novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. *JOURNAL OF PATHOGENS*. 2011, vol. 2011, 1-13
 11. BISWAL, I.; MOHAPATRAS, S.; DEB, M.; DAWAR, R.; GAIND, R. *Corynebacterium striatum*: an emerging nosocomial pathogen in a cas of laryngeal carcinoma. *INDIAN JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY*. 2014, vol. 32, issue 3, 323-324
 12. BOATENG, J. S.; MATTHEWS, K. H.; STEVENS, H. N. E.; ECCLESTON, G. M. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*. 2008, vol. 97, issue 8, 2892-2923
 13. BOWLER, P. G.; DUERDEN, B. I.; ARMSTRONG, D. G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*. 2001, vol. 14, issue 2, 244-269
 14. BRAMHACHARI, P. V.; KAUL, S. Y.; MCMILLAN, D. J.; SHAILA, M. S.; KARMARKAR, M.G.; SRIPRAKASH, K. S. Disease burden due to *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (group G and C streptococcus) is higher than that due to *Streptococcus pyogenes* among Mumbai school children. *JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY*. 2010, vol. 29, 220-223
 15. BRAZIER, J. S.; HALL, V.; MORRIS, T. E.; GAL, M.; DUERDEN, B. I. Antibiotic susceptibilities of gram-positive anaerobic cocci: results of a sentinel study

in England and Wales. *JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY*. 2003, vol. 52, 224-228

16. BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, CH. E. Wound healing: an overview. *PLASTIC AND RECONSTRUCTIVE SURGERY*. 2006, vol. 117, issue 7S, 1e-S- 32e-S
17. CLARK, R.; BRADBURY, S. SILVERCEL® Non-Adherent made easy. *WOUNDS INTERNATIONAL*. 2010, 1 (5)
18. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 23rd information supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: CLSI. 2013
19. DEMLING, R. H. Effect of silver delivery system (Acticoat) on re-epithelization rate of meshed allografts. *Presented on the Symposium on Advanced wound care*. Las Vegas, Nevada, 2001
20. DOWD, S. E.; SUN, Y.; SECOR, P. E.; RHOADS, D. D.; WOLCOTT, B. M.; JAMES, G. A.; WOLCOTT, R. D. Research article: Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing, *BIOMED CENTRAL MICROBIOLOGY*, 2008a
21. DOWD, S. E.; WOLCOTT, R. D.; SUN, Y.; McKEEHAN, T.; SMITH, E.; RHOADS, D. Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer, biofilm infections determined using bacterial tag, encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *PLOS ONE*. 2008b, vol. 3, issue 10, e3326
22. DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *FRONTIERS IN BIOSCIENCE*. 2004, vol. 9, 283-289
23. EUCAST. Disková difúzní metoda pro vyšetření citlivosti k antibiotikům. Verze 6.0. 2017a. Dostupné z:
http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Diskova_metoda/EUCAST_Diskova_difuze_Manual_v_6.0.pdf

24. EUCAST. Příprava půd pro diskovou difúzní metodu EUCAST a pro vyšetření hodnoty MIC bujonovou mikrodiluční metodou. Verze 5.0. 2017b. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/priprava_pud/Priprava_pud_v_5.0_2017.pdf
25. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1. 2017c. Dostupné z: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf
26. EZAKI, T.; KAWAMURA, Y.; LI, N.; LI, Z. Y.; SHU, S. Proposal of the genera *Anaerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Gallicola* gen. nov. for members of the genus *Peptostreptococcus*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 2001, vol. 51, 1521-1528
27. FERNÁNDEZ-CANIGIA, L.; LITTERIO, M.; LEGARIA, M. C.; CASTELLO, L.; PREDARI, S. C.; DI MARTINO, A.; ROSSETTI, A.; ROLLET, R.; CARLONI, G.; BIANCHINI, H.; CEJAS, D.; RADICE, M.; GUTKIND, G.; AND THE ANAEROBE SURVEILLANCE TEAM. First national survey of antibiotic susceptibility of the *Bacteroides fragilis* group: emerging resistance to carbapenems in Argentina. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 2012, vol. 56, no. 3, 1309-1314
28. FONDER, M. A.; LAZARUS, G. S.; COWAN, D. A.; ARONSON-COOK, B.; KOHLI, A. R.; MAMELAK, A. J. Treating the chronic wound: a practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY*. 2008, vol. 58, issue 2, 185-206
29. FUNKE, G.; BERNARD K. Coryneform gram-positive rods. Chapter 26 in: VERSALOVIC, J.; ET AL., editor. *Manual of clinical microbiology*. American society for microbiology press, Washington DC, USA, 2011, 10. Vydání, 2630s., ISBN 9781555816728

30. GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *PATHOGENS AND DISEASE*. 2013, vol. 67, 159-173
31. GLAZUNOVA, O.; RAOULT, D.; ROUX, V. Partial *recN* gene sequencing: a new tool for identification and phylogeny within the genus *Streptococcus*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 2010, vol. 60, 2140-2148
32. GUO, S.; DIPIETRO, L.,A. Factors affecting wound healing. *CRITICAL REVIEWS IN ORAL BIOLOGY AND MEDICINE*. 2010, 89 (3), 219-229
33. HART, J. Inflammation 1: its role in the healing of acute wounds. *JOURNAL OF WOUND CARE*. 2002, vol. 11, issue 6, 205-209
34. HECHT, D. W. Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments. *ANTIMICROBIAL RESISTANCE*. 2004, vol. 39, 92-97
35. HOLLINWORTH, H. Pain at wound dressing related products: a template for assessment. 2005. Dostupné z :
<http://www.worldwidewounds.com/2005/august/Hollinworth/Framework-Assessing-Pain-Wound-Dressing-Related.html>
36. IRAZ, M.; BILSEL, K.; CEYLAN, H.; AKKOYUNLU, Y. *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*; an agent rarely encountered in the etiology of septic arthritis *JUNDISHAPUR JOURNAL OF MICROBIOLOGY*. 2013, 6 (7), 1-3
37. JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The family *Enterobacteriaceae*. Chapter 20 in: GOLDMAN, E.; GREEN, L. H., editor. *Practical handbook of microbiology*. CRC Press Taylor and Francis group: Boca Raton, 2015, 3. vydání, 987s., ISBN 13:978-1-4665-8740-3
38. JAWIEŃ, A.; SZEWCZYK, M. T.; KASZUBA, A.; GACIONG, Z.; KRASIŃSKI, Z.; WRÓŃSKI, J.; GRZELA, T.; KOBLIK, T. Wytuczne ekspertów w sprawie gojenia owrzodzeń żylnych goleni. *LECZENIE RAN*. 2011, vol. 8, 59-80

39. JENSEN, A.; KILIAN, M. Delineation of *Streptococcus dysgalactiae*, its subspecies, and its clinical and phylogenetic relationship to *Streptococcus pyogenes*. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 2012, vol. 50, no. 1, 113-126
40. JONES, V.; GREY, J. E.; HARDING, K. G. ABC of wound healing: wound dressings *BRITISH MEDICAL JOURNAL*. 2006, vol. 332, 777-780
41. KÖNÖNEN, E.; BRYK, A.; NIEMI, P.; KANERVO-NORDSTRÖM, A. Antimicrobial susceptibilities of *Peptostreptococcus anaerobius* and the newly described *Peptostreptococcus stomatis* isolated from various human sources. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 2007, vol. 51, 2205-2207
42. LANSDOWN, A. B. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. *JOURNAL OF WOUND CARE*. 2002, vol. 11, 125-130
43. LAWSON, P. A.; JOHNSON, C. N.; BENGTSSON, L.; CHARALAMPAKIS, G.; DAHLÉN, G.; MOORE, E.; FALSEN, E. *Peptostreptococcus canis* sp. nov., isolated from subgingival plaque from canine oral cavity. *ANAEROBE*. 2012, vol. 18, issue 6, 597-601
44. LEAPER, D. J. Silver dressings: their role in wound management. *INTERNATIONAL WOUND JOURNAL*. 2006, 3:4, 282-294
45. LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. *CLINICS IN DERMATOLOGY*. 2007, vol. 25, 9-18
46. MA, H.; O'DONNELL, T. F. Jr.; ROSEN, N. A.; IAFRATI, M. D. The real cost of treating venous ulcers in a contemporary vascular practise. *JOURNAL OF VASCULAR SURGERY: VENOUS AND LYMPHATIC DISORDERS*. 2014, vol. 2, no. 4, 355-361
47. MALINI, A.; DEEPA, E. K.; MANOHAR, P. V.; BORAPPA, K.; PRASAD, S. R. Soft tissue infections with *Arcanobacterium haemolyticum*: Report of three cases. *INDIAN JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY*. 2008, vol. 26, issue 2, 192-195

48. MARTIN, M. Physiology of wound healing, Chapter 3 in: FLANAGAN, M., editor. *Wound healing and skin integrity – Principles and practice*. Chichester: Wiley-Blackwell, 2013, 312s., ISBN 978-0-470-65977-9
49. MEYER, D. K.; REBOLI, K.C. Other Coryneform bacteria and *Rhodococcus*. Chapter 203 in: MANDELL, G. L.; ET AL., editor. *Principles and practice of infectious diseases*. Elsevier Publication: Philadelphia, USA, 2005, 6. vydání, vol. 2, 2470s.
50. MISSIAKAS. D.; SCHNEEWIND, O. *Staphylococcus aureus* and related Staphylococci. Chapter 25 in: GOLDMAN, E.; GREEN, L. H., editor. *Practical handbook of microbiology*. CRC Press Taylor and Francis group: Boca Raton, 2015, 3. vydání, 987s., ISBN 13:978-1-4665-8740-3
51. MIYAMOTO, H.; SUZUKI, T.; MURAKAMI, S.; FUKUOKA, M.; TANAK, Y.; KONDO, T.; NISHIMIYA, T.; SUEMORI. K.; TAUCHI, H.; OSAWA, H. Bacteriological characteristics of *Arcanobacterium haemolyticum* isolated from seven patients with skin and soft-tissue infections. *JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY*. 2015, vol. 64, 369-374
52. MONACO, J. L.; LAWRENCE, W. T. Acute wound healing: an overview. *CLINICS IN PLASTIC SURGERY*. 2003, vol. 30, issue 1, 1-12
53. MRÁZOVÁ, R.; POKORNÁ, A.; KREJCAR, M. Možnosti v hojení ran, *MEDICÍNA PRO PRAXI*. 2012, 9 (2), 83-86
54. MURDOCH, D. A.; SHAH, H. N. Reclassification of *Peptostreptococcus magnus* (Prevot 1933) Holdeman and Moore 1972 as *Finegoldia magna* comb. nov. and *Peptostreptococcus micros* (Prevot 1933) Smith 1957 as *Micromonas micros* comb. nov. *ANAEROBE*. 1999, vol. 5, 555-559
55. MURPHY, E. C.; FRICK, I. M. Gram-positive anaerobic cocci-commensals and opportunistic pathogens. *FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS*. 2013, vol. 37, 520-553

56. NABER, C. K. *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Epidemiology, Pathophysiology, and Management Strategies. *CLINICAL INFECTIOUS DISEASES*. 2009, vol. 48, 231-237
57. NG, M. F. Y. The role of mast cells in wound healing. *INTERNATIONAL WOUND JOURNAL*. 2010, vol. 7, issue 1, 55-61
58. ORTEZ, J. H. Disk diffusion testing. Chapter 4 in: COYLE, M. B., editor. *Manual of antimicrobial susceptibility testing*. Washington DC: American society for microbiology press, 2005, 231s., ISBN 1-55581-349-6
59. PALLERONI, N. J. The genus *Pseudomonas*. Chapter 21 in: GOLDMAN, E.; GREEN, L. H., editor. *Practical handbook of microbiology*. CRC Press Taylor and Francis group: Boca Raton, 2015, 3. vydání, 987s., ISBN 13:978-1-4665-8740-3
60. PARIJA, S. C. *Textbook of microbiology & immunology*, 1. vydání, Haryana: Elsevier, 2009, 700s., ISBN 978-81-312-2163-1
61. PARIJA, S. C.; KALIAPERUMAL, V.; KUMAR, S. V.; SUJATHA, S.; BABU, V.; BALU, V. *Arcanobacterium haemolyticum* associated with pyothorax: case report. *BIOMED CENTRAL INFECTIOUS DISEASES*. 2005, 5: 68, Dostupné online: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-5-68>
62. POSPÍŠILOVÁ, A.; ŠVESTKOVÁ, S. *Léčba chronických ran*. 1. vydání, Brno: IDVPZ, 2001, 72s., ISBN 80-7013-348-1
63. POSPÍŠILOVÁ, A. Základní principy péče o chronickou ránu. *INTERNÍ MEDICÍNA PRO PRAXI*. 2009, 11(3), 129-133
64. POSPÍŠILOVÁ, A. Léčba chronických ran moderními krycími prostředky, *PRAKTICKÉ LÉKÁRENSTVÍ*. 2010, 6(6), 276-281
65. POSPÍŠILOVÁ, A. Diferenciální diagnostika bércových vředů. *MEDICAL TRIBUNE*. 2012, 8 (16), C2-C3

66. RAJA, N. S., Microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Malaysia: a retrospective study of 194 cases, *JOURNAL OF MICROBIOLOGY, IMMUNOLOGY AND INFECTION*, 2007, vol. 40, 39-44
67. RANKIN, I. D. MIC testing. Chapter 15 in: COYLE, M. B., editor. *Manual of antimicrobial susceptibility testing*. Washington DC: American society for microbiology press, 2005, 231s., ISBN 1-55581-349-6
68. RIBERIO, M.G.; RISSETI, R. M.; BOLAÑOS, C. A. D.; CAFFARO, K. A.; DE MORAIS, A. C. B.; LARA, G. H. B.; ZAMPROGNA, T. O.; PAES, A. C.; LISTONI, F. J. P.; FRANCO, M. M. J. *Trueperella pyogenes* multispecies infections in domestic animals: a retrospective study of 144 cases (2002 to 2012). *VETERINARY QUATERLY*. 2015, vol. 32, no. 2, 82-87
69. RICHARDS, V. P.; LANG, P.; PAVINSKI BITAR, P. D.; LEFÉBURE, T.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N.; STANHOPE, N. J. Comparative genomics and the role of lateral gene transfer in the evolution of bovine adapted *Streptococcus agalactiae*. *INFECTIONS, GENETICS AND EVOLUTION*. 2011, 11(6), 1263-1275
70. RIPPON, M.; DAVIES, P.; WHITE, R. J.; BOSANQUET, N. The health economics of atraumatic dressing use: Analysis of cost- effectiveness based on Publisher literature. *JOURNAL OF WOUND CARE*. 2008
71. SCALI, CH.; KUNIMOTO, B. An update on chronic wounds and the role of biofilms. *JOURNAL OF CUTANEOUS MEDICINE AND SURGERY*. 2013, vol. 17, issue 6, 371-376
72. SENG, P.; BARBE, M.; PINELLI, P. O.; GOURIET, F.; DRANCOURT, M.; MINEBOIS, A.; CELLIER, N.; LECHICHE, C.; ASENCIO, G.; LAVIGNE, J. P.; SOTTO, A.; STEIN, A. *Staphylococcus caprae* bone and joint infections: a re-emerging infection? *CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION*. 2014, 20, 1052-1058
73. SHIPPERLEY, T.; MARTIN, C. The physiology of wound healing: an emergency response. *NURSING TIMES*. 2002, vol. 98, issue 8, 54-55

74. SMITH, S. Successful management of infected wounds using a solution and gel containing betaine and PHMB. *WOUND PRACTICE AND RESEARCH*. 2013, vol. 21, no. 4, 183-185
75. SNYDMAN, D. R.; JACOBUS, N. V.; MCDERMOTT, L. A.; RUTHAZER, R.; GOLAN, Y.; GOLDSTEIN, E. J.; FINEGOLD, S. M.; HARRELL, L. J.; HECHT, D. W.; JENKINS S. G.; PIERSON, C.; VENEZIA, R.; YU, V.; RIHS, J.; GORBACH, S. L. National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends in the United states from 1997 to 2004. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 2007, vol. 51, 1649-1655
76. SNYDMAN, D. R.; JACOBUS, N. V.; MCDERMOTT, L. A.; GOLAN, Y.; GOLDSTEIN, E. J.; HARELL, L.; JENKINS, S.; NEWTON, D.; PIERSON, C.; ROSENBLATT, J.; VENEZIA, R.; GORBACH, S. L.; QUEENAN, A. M.; HECHT, D. W. Update on resistance of *Bacteroides fragilis* group and related species with special attention to carbapenems 2006-2009. *ANAEROBE*. 2011, vol. 17, 147-151
77. SÓKI, J.; GAL, M.; BRAZIER, J. S.; ROTIMI, V. O.; URBÁN, E.; NAGY, E.; DUERDEN, B. I. Molecular investigation of genetic elements contributing to metronidazole resistance in *Bacteroides* strains. *JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY*. 2006, vol. 57, 212-220
78. SPELLERBERG, B.; BRANDT, C. *Streptococcus*. Chapter 22 in: JORGENSEN, J.; ET AL., editor. *Manual of clinical microbiology*. American society for microbiology press, Washington DC, USA, 2015, 11. vydání, 2892s., ISBN 9781555817381
79. STEPHEN-HAYNES, J.; TONER, L. Assessment and management of wound infection: the role of silver. *BRITISH JOURNAL OF COMMUNITY NURSING*. 2007, vol. 12, issue 3, S6-S12
80. STRYJA, J. Aktivní přístup v hojení chronických ran. *MEDICAL TRIBUNE*. 2007, 3 (30), C1-C2

81. STRYJA, J.; KRAWCZYK, P.; HÁJEK, M.; JALŮVKA, F. *Repetitorium hojení ran* 2. 1. vydání, Semily: GEUM, 2011, 371s., ISBN 978-80-86356-79-5
82. STRYJA, J. Zásady racionální antimikrobiální terapie v managementu ran. *LÉČBA RAN*. 2017, 1, 16-20
83. SUPERTI, S. V.; MARTINS, DDE S.; CAIERÃO, J.; SOARES, F.; PROCHNOW, T.; CANTARELLI, V. V.; ZAVASCKI, A. P. *Corynebacterium striatum* infecting a malignant cutaneous lesion: The emergence of an opportunistic pathogen. *REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO*. 2009, vol. 51, 115-116
84. SUSSMAN, C.; BATES-JENSEN, B. M. Wound healing physiology: acute and chronic. *Wound care: a collaborative practice manual for health professionals*. 4. vydání, Baltimore MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2011, 832s., ISBN 9781608317158
85. ŠPAČEK, J.; BUCHTA, V.; JÍLEK, P. *Vulvovaginální dyskomfort a poruchy poševního prostředí*. 1. Vydání, Praha: Grada, 2013, 360s., ISBN 978-80-247-4554-1
86. ŠVEC, P.; PANTŮČEK, R.; SEDLÁČEK, I.; PETRÁŠ, P. Aktuální změny v taxonomii rodu *Staphylococcus*. *ZPRÁVY CENTRA EPIDEMIOLOGIE A MIKROBIOLOGIE (SZÚ, PRAHA)*. 2015, 24 (4), 140-143
87. TADESSE, A.; ALEM, M. Lecture notes: Medical Bacteriology. *ETHIOPIA PUBLIC HEALTH TRAINING INITIATIVE*. University of Gondar, 2006, 433s.
88. THERON, M. M.; JANSE VAN RENSBURG, M. N.; CHALKLEY, L. J. Nitroimidazole resistance gene (*nimB*) in anaerobic gram-positive cocci (previously *Peptostreptococcus* spp. *JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY*. 2004, vol. 54, 240-242
89. TIMMONS, T. D. Alginates and hydrofiber dressing. *PROFESSIONAL NURSE*. 1999, 14 (7), 496-499, 501, 503

90. TIWARI, S.; PRATYUSH, D. D.; DWIVEDI, A.; GUPTA, S. K.; RAI, M.; SINGH, S. K. Microbiological and clinical characteristics of diabeti foot infections in northern India. *THE JOURNAL OF INFECTION IN DEVELOPING COUNTRIES*. 2012, 6(4), 329-332
91. UCKAY, I.; PITTET, D.; VAUDAUX, P.; SAX, H.; LEW, D.; WALDVOGEL, F. Foreign body infection due to *Staphylococcus epidermidis*. *ANNALS OF MEDICINE*. 2009, 41, 109-119
92. VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the celula rand molecular mechanism. *THE JOURNAL OF INTERNATIONAL MEDICAL RESEARCH*. 2009, 35 (7) 12, 1528-1542
93. VELOO, A. C.; WELLING, G. W.; DEGENER, J. E. Antimicrobial susceptibility of clinically relevant gram-positive anaerobic cocci collected over a three-year period in the Netherlands. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 2011, vol. 55, 1199-1203
94. VOJTKOVÁ, H.; KOSINA, M.; SEDLÁČEK, I.; MAŠLAŇOVÁ, I.; HARWOTOVÁ, M.; MOLINKOVÁ V. Characterization of *Pseudomonas monteillii* CCM 3423 and its physiological potential for biodegradation of selected organic pollutants. *FOLIA MICROBIOLOGICA*. 2015, vol. 60, issue 5, 411-416
95. WALL, I. B.; DAVIES, C. E.; HILL, K. E.; WILSON, M.J.; STEPHENS, P.; HARDING, K. G.; THOMAS, D. W. Potencial role of anaerobic cocci in impaired human wound healing. *WOUND REPAIR AND REGENERATION*. 2002, vol. 10, issue 6, 346-353
96. WATANABE, S.; KIRIKAE, T.; MIYOSHI-AKIYAMA, T. Complete genome sequence of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 167 carrying Lancefield group C antigen and comparative genomics of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strains. *GENOME BIOLOGY AND EVOLUTION*. 2013, vol. 5, 1644-1651
97. WHITE, R. J. Pain assesment and management in patiens with chronic wounds. *NURSING STANDARD*. 2008, vol. 22, issue 32, 62-68

98. ZAMBON. J. J.; HARASZTHY, V. I. Other anaerobic bacteria: *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Fusobacterium*, and gram-positive anaerobic cocci. Chapter 44 in: GOLDMAN, E.; GREEN, L. H., editor. *Practical handbook of microbiology*. CRC Press Taylor and Francis group: Boca Raton, 2015, 3. vydání, 987s., ISBN 13:978-1-4665-8740-3
99. Hcel produktová informace. Dostupné z: <http://www.holzbecher.net/upload/ke-stazeni/hcel-produktova-informace-1.2.2014.pdf>, [cit. 27. 4. 2017]

ZDROJE OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Fáze hojení: a) maturační fáze; b) proliferační fáze; c) maturační fáze – Dostupné z: <http://www.nature.com/nature/journal/v453/n7193/images/nature07039-f1.2.jpg>

Obrázek 2 Antimikrobiální účinky stříbra – Dostupné z: http://www.linnea.ch/media/5003/schema_03.gif

Obrázek 3 *Corynebacterium striatum* barvené dle Grama – Dostupné z: <http://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-micrographs/gram-stain/gram-positive/corynebacterium-striatum-gram.jpg>

Obrázek 4 Měření inhibičních zón- vlevo: manuálně; vpravo: digitálním zařízením – **ORTEZ, J. H.**, Chapter 4: Disk diffusion testing in *Manual of antimicrobial susceptibility testing* (edited by Coyle, M. B.), Washington DC: American society for microbiology press, 2005, 231s., ISBN 1-55581-349-6

Obrázek 5 Odečítání hodnoty MIC u E-testu – Dostupné z: <http://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/etest-mic-technique-b.jpg>

Obrázek 6 Zkumavková diluční metoda – Dostupné z: <https://classconnection.s3.amazonaws.com/151/flashcards/2859151/jpg/picture201315238780208-14549516A4C1946A23F.jpg>

Obrázek 7 Mikrodiluční metoda – Dostupné z: http://www.frontiersin.org/files/Articles/78873/fcimb-04-00036-HTML/image_m/fcimb-04-00036-g001.jpg

PŘÍLOHY

Příloha 1: *Staphylococcus aureus* na krevním agaru (24 h, 37 °C, aerobně)

Příloha 2: *Escherichia coli* na krevním agaru (24 h, 37 °C, aerobně)

Příloha 3: *Escherichia coli* na XLD agaru (24 h, 37 °C, aerobně)

Příloha 4: *Proteus sp.* na krevním agaru (24 h, 37 °C, aerobně)

Příloha 5: *Peptostreptococcus anaerobius* na Schaedler agaru (24 h, 37 °C, anaerobně)

Příloha 6: *Peptoniphilus harei* na Schaedler agaru (24 h, 37 °C, anaerobně)

Příloha 7: *Finegoldia magna* na Schaedler agaru (24 h, 37 °C, anaerobně)

Příloha 8: Citlivost *Peptostreptococcus anaerobius* 1 (Schaedler agar, 48 h, 37 °C, anaerobně)

Příloha 9: Citlivost *Peptostreptococcus anaerobius* 2 (Schaedler agar, 48 h, 37 °C, anaerobně)

Příloha 10: Citlivost *Peptostreptococcus anaerobius* 3 (Schaedler agar, 48 h, 37 °C, anaerobně)

Příloha 11: Citlivost *Peptostreptococcus anaerobius* z Litomyšlské Nemocnice (Schaedler agar, 48 h, 37 °C, anaerobně)

Příloha 12: Citlivost *Peptoniphilus harei* 1 (Schaedler agar, 48 h, 37 °C, anaerobně)

Příloha 13: Citlivost *Peptoniphilus harei* 2 (Schaedler agar, 48 h, 37 °C, anaerobně)

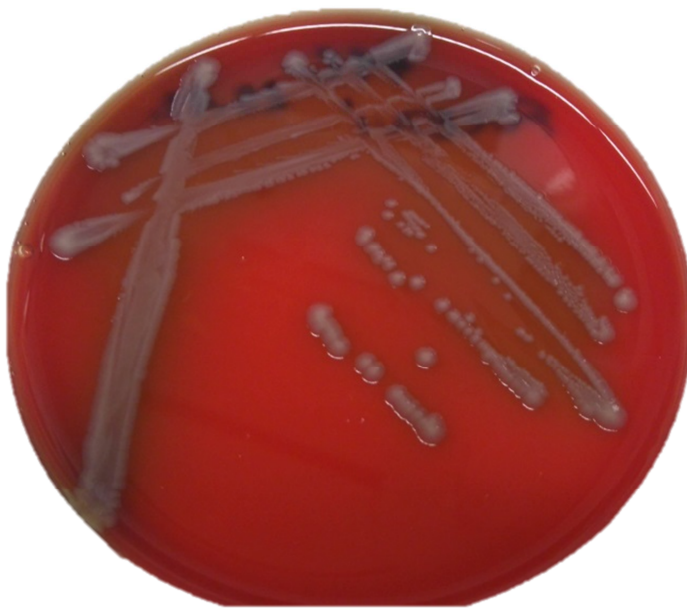
Příloha 14: Citlivost *Peptoniphilus harei* 3 (Schaedler agar, 48 h, 37 °C, anaerobně)

Příloha 15: Citlivost *Peptoniphilus harei* z Litomyšlské Nemocnice (Schaedler agar, 48 h, 37 °C, anaerobně)

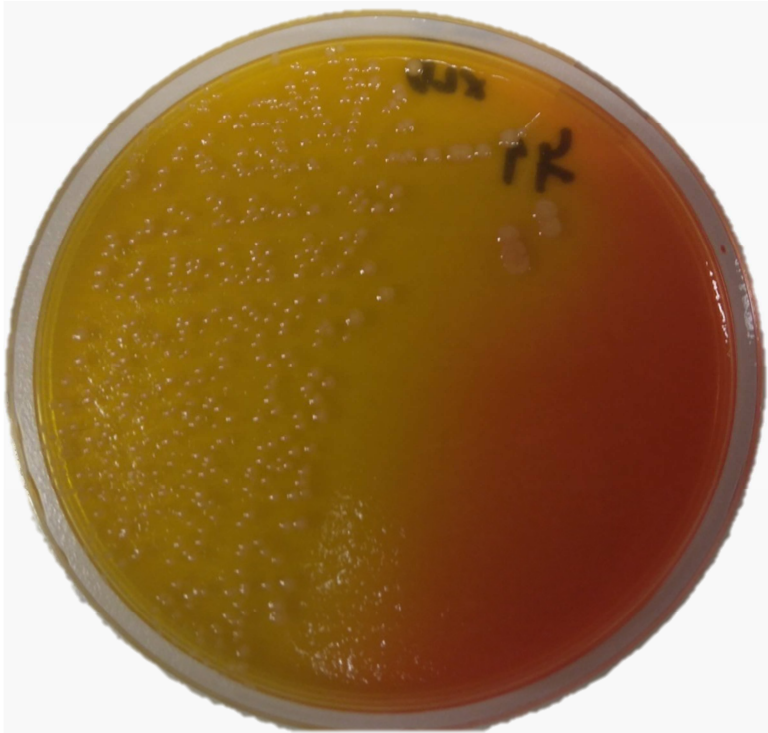
Příloha 16: Citlivost *Finegoldia magna* (Schaedler agar, 48 h, 37 °C, anaerobně)



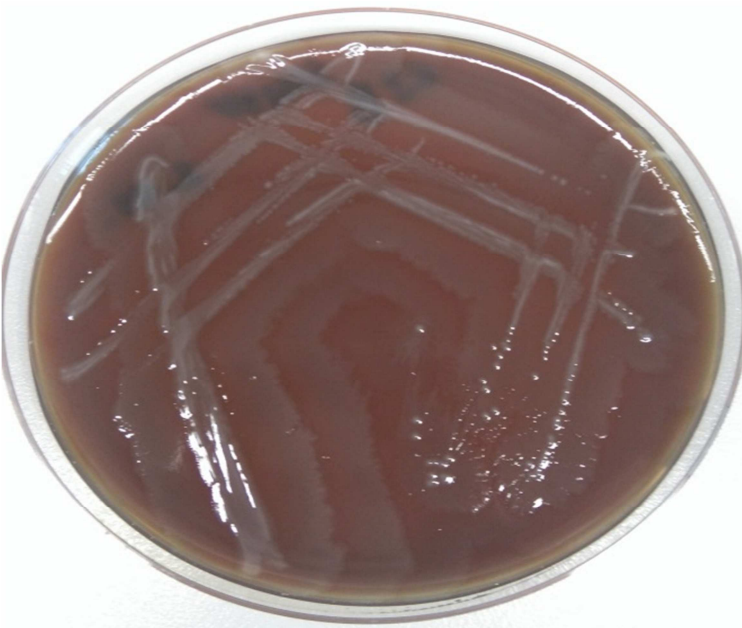
Příloha 1: *Staphylococcus aureus* na krevním agaru (24 h, 37 °C, aerobně), [foto autor]



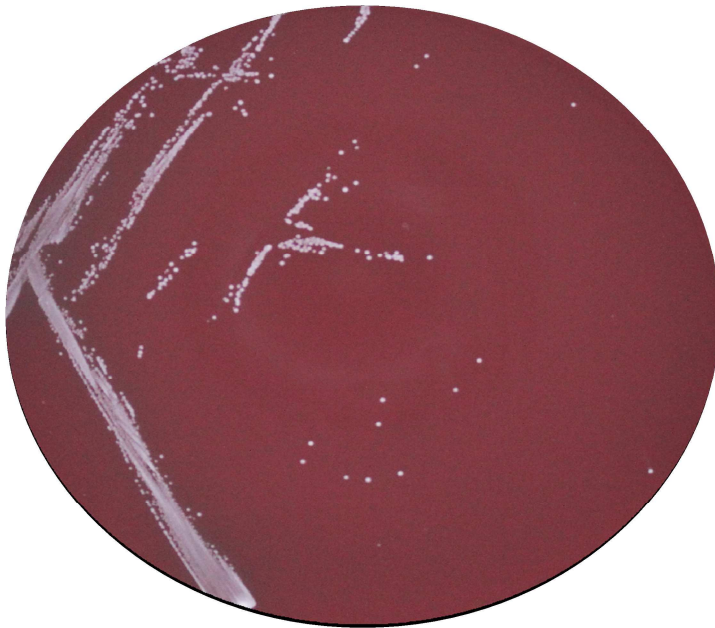
Příloha 2: *Escherichia coli* na krevním agaru (24 h, 37 °C, aerobně), [foto autor]



Příloha 3: *Escherichia coli* na XLD agaru (24 h, 37 °C, aerobně), [foto autor]



Příloha 4: *Proteus sp.* na krevním agaru (24 h, 37 °C, aerobně), [foto autor]



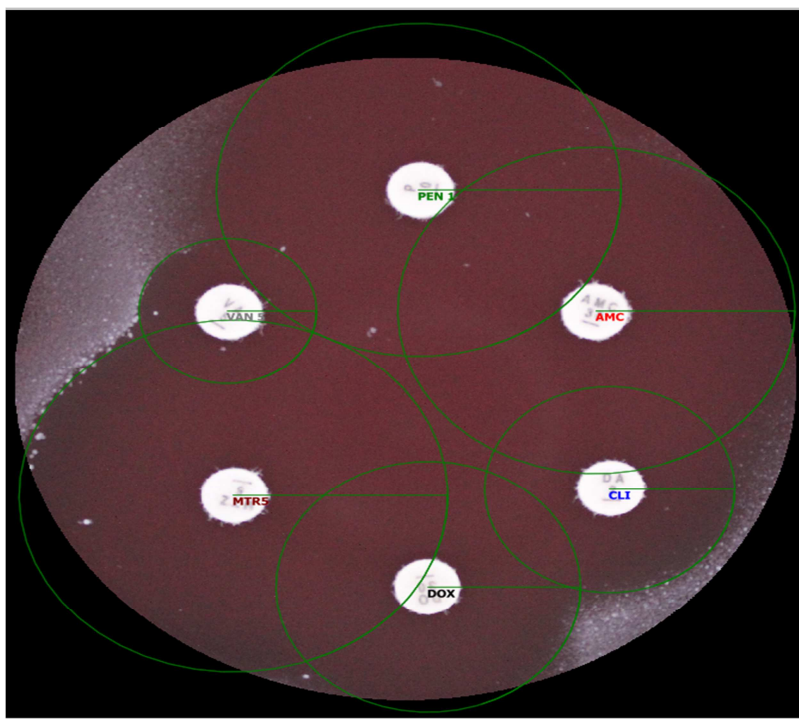
Příloha 5: *Peptostreptococcus anaerobius* na Schaedler agaru (24 h, 37 °C, anaerobně), [foto autor]



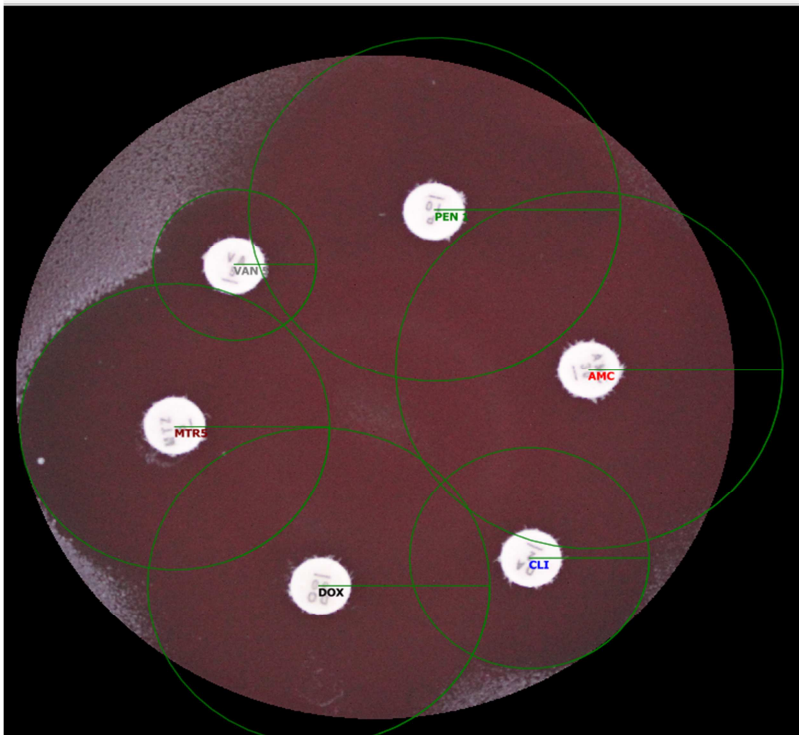
Příloha 6: *Peptoniphilus harei* na Schaedler agaru (24 h, 37 °C, anaerobně), [foto autor]



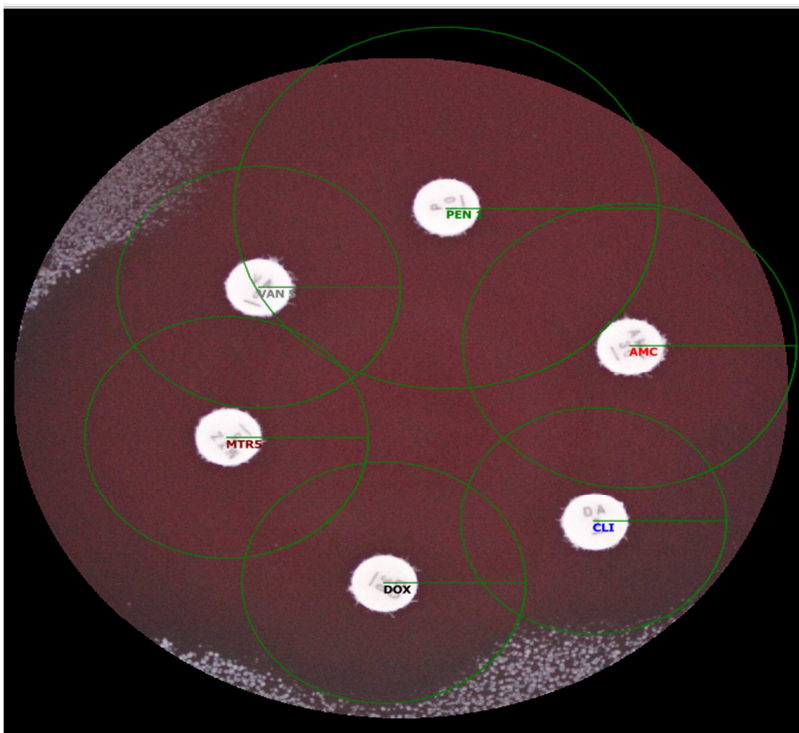
Příloha 7: *Finegoldia magna* na Schaedler agaru (24 h, 37 °C, anaerobně), [foto autor]



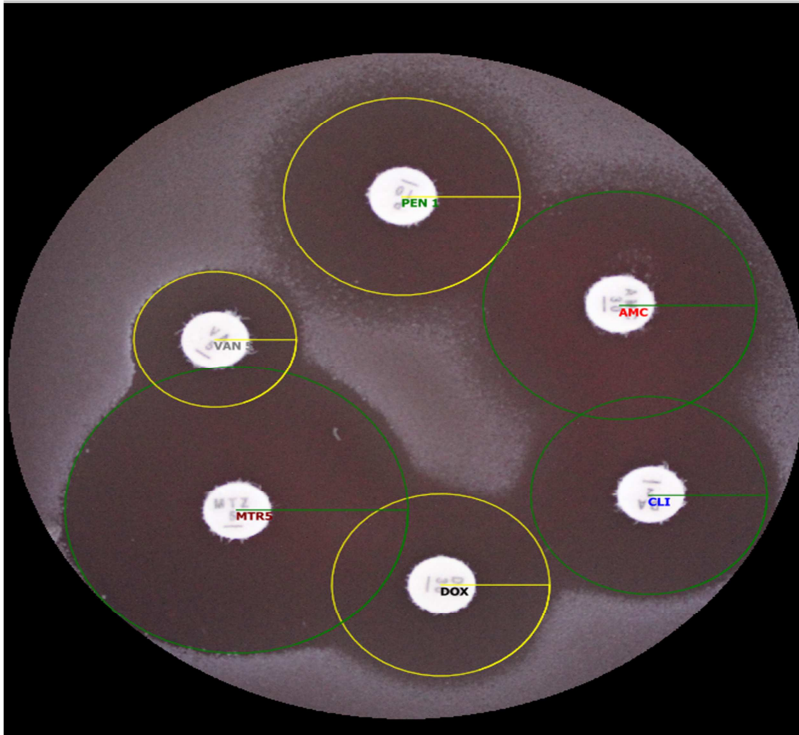
Příloha 8: Citlivost *Peptostreptococcus anaerobius* 1 (Schaedler agar, 48 h, 37 °C, anaerobně). [foto autor], měřeno pomocí BACMED 6iG2. Zelená barva - S (Citlivý).



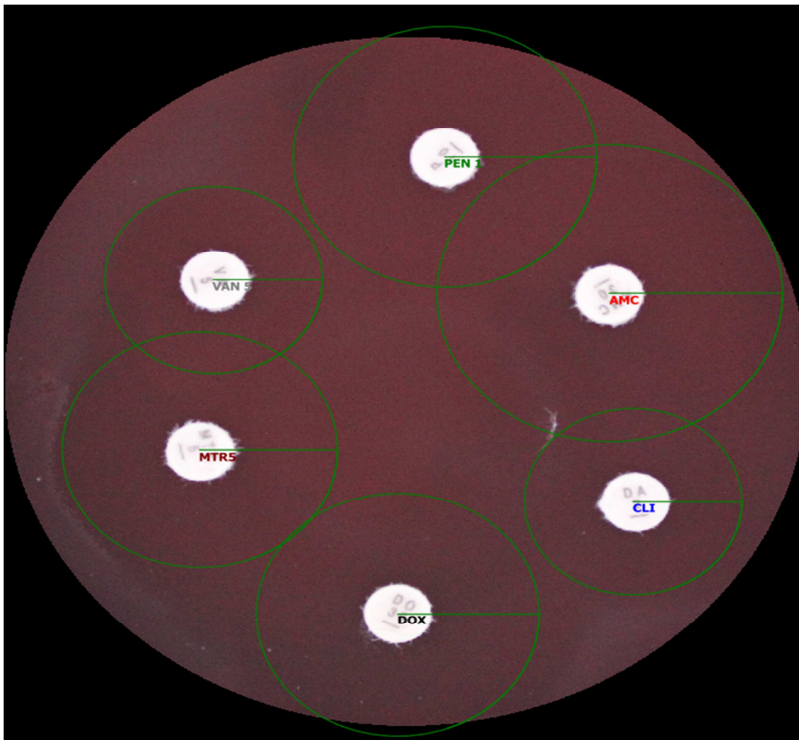
Příloha 9: Citlivost *Peptostreptococcus anaerobius* 2 (Schaedler agar, 48 h, 37 °C, anaerobně). [foto autor], měřeno pomocí BACMED 6iG2. Zelená barva - S (Citlivý).



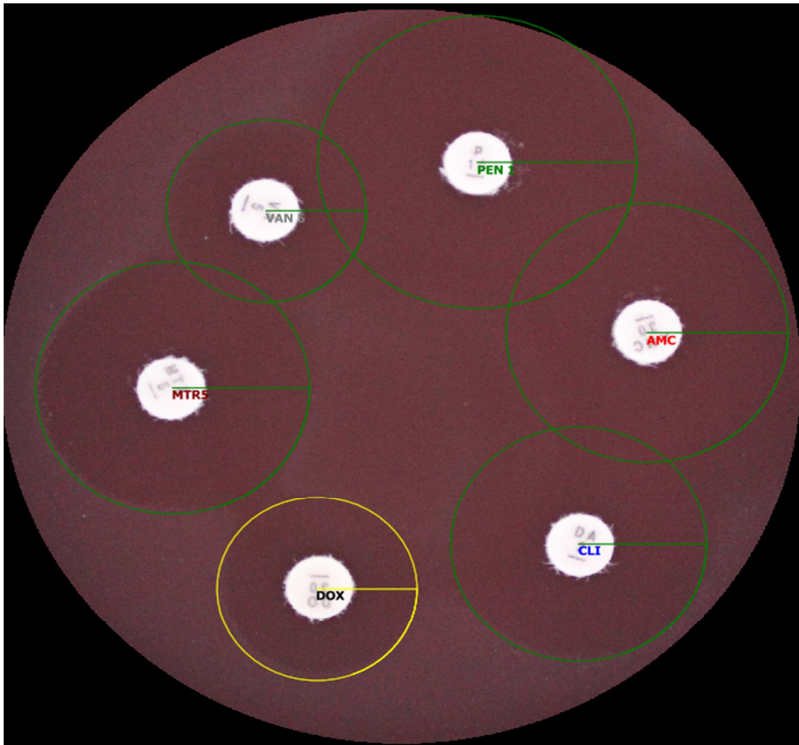
Příloha 10: Citlivost *Peptostreptococcus anaerobius* 3 (Schaedler agar, 48 h, 37 °C, anaerobně). [foto autor], měřeno pomocí BACMED 6iG2. Zelená barva - S (Citlivý).



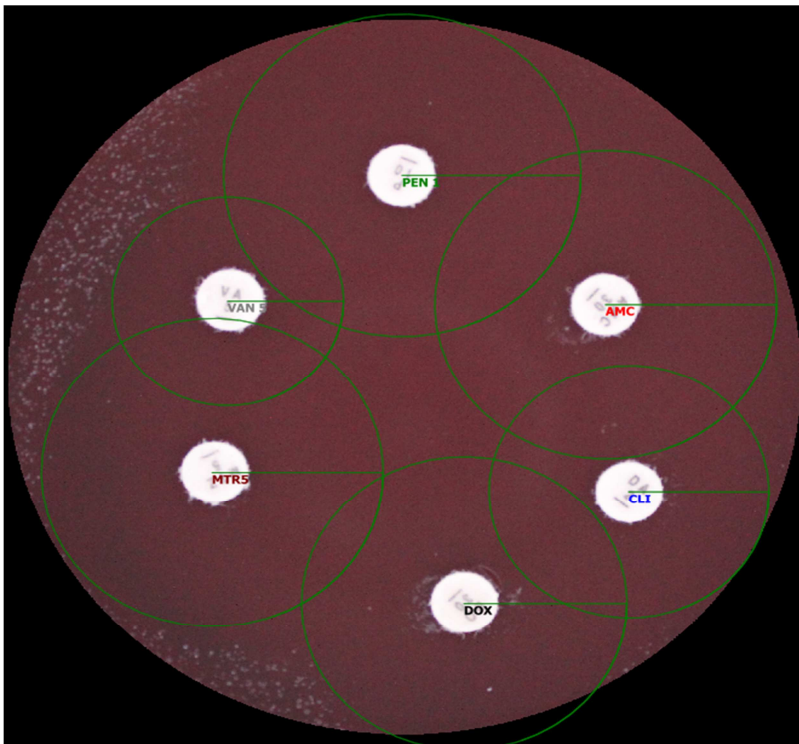
Příloha 11: Citlivost *Peptostreptococcus anaerobius* z Litomyšlské Nemocnice (Schaedler agar, 48 h, 37 °C, anaerobně). [foto autor], měřeno pomocí BACMED 6iG2. Zelená barva - S (Citlivý), žlutá barva - I (Intermediálně citlivý).



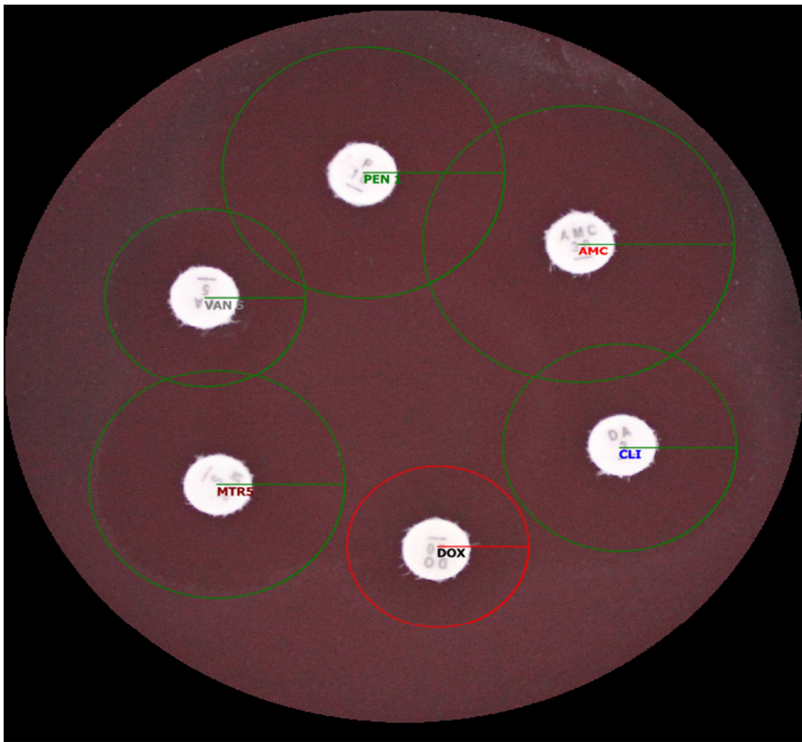
Příloha 12: Citlivost *Peptoniphilus harei* 1 (Schaedler agar, 48 h, 37 °C, anaerobně). [foto autor], měřeno pomocí BACMED 6iG2. Zelená barva - S (Citlivý).



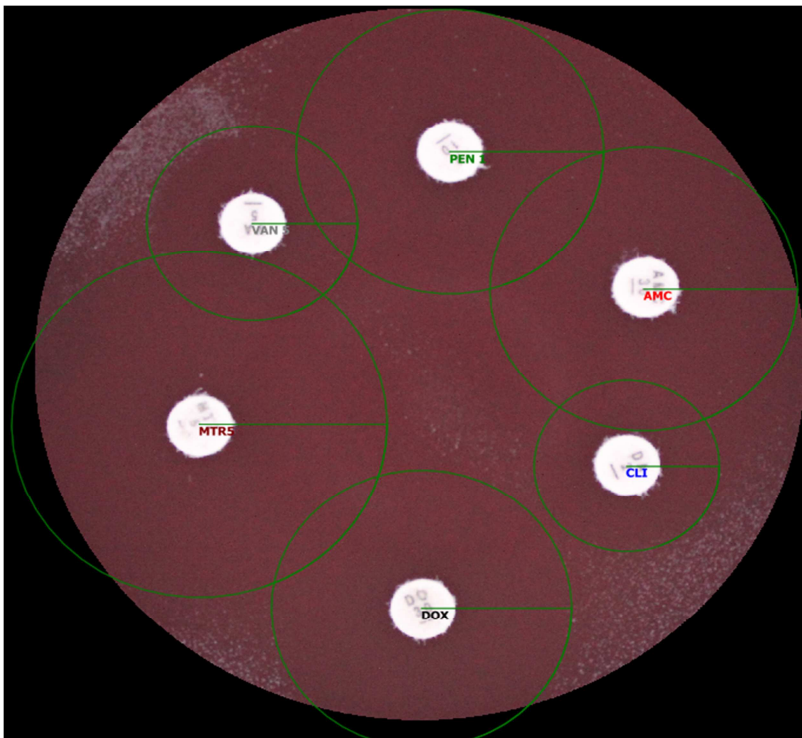
Příloha 13: Citlivost *Peptoniphilus harei* 2 (Schaedler agar, 48 h, 37 °C, anaerobně). [foto autor], měřeno pomocí BACMED 6iG2. Zelená barva - S (Citlivý), žlutá barva - I (Intermediálně citlivý).



Příloha 14: Citlivost *Peptoniphilus harei* 3 (Schaedler agar, 48 h, 37 °C, anaerobně). [foto autor], měřeno pomocí BACMED 6iG2. Zelená barva - S (Citlivý).



Příloha 15: Citlivost *Peptoniphilus harei* z Litomyšlské Nemocnice (Schaedler agar, 48 h, 37 °C, anaerobně). [foto autor], měřeno pomocí BACMED 6iG2. Zelená barva - S (Citlivý), červená barva - R (Rezistentní).



Příloha 16: Citlivost *Finegoldia magna* (Schaedler agar, 48 h, 37 °C, anaerobně). [foto autor], měřeno pomocí BACMED 6iG2. Zelená barva - S (Citlivý).