

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Průkaz vybraných druhů rodu *Capnocytophaga* v zubním plaku

Diplomová práce

2024

Bc. Lucie Horká

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Horká**
Osobní číslo: **C22368**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Průkaz vybraných druhů rodu *Capnocytophaga* v zubním plaku**
Téma práce anglicky: **Detection of *Capnocytophaga* Species in Dental Plaque Samples**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Vypracovat literární rešerši zaměřenou na mikroflóru dutiny ústní.
2. V krátkosti popsat mikroorganismy, které mají vztah k onemocnění parodontu.
3. Zaměřit se především na kapnofilní mikroorganismy.
4. Shmout možnosti laboratorní diagnostiky.

Experimentální část:

1. Vypracovat dotazník určený pro klienty poskytující vzorek z dutiny ústní.
2. Zpracovat vzorky z dutiny ústní metodami kultivačními a molekulárně biologickými.
3. Výsledky zpracovat do přehledných tabulek.
4. Vyhodnotit získané výsledky a porovnat s publikovanými údaji.
5. Diplomovou práci zpracovat v souladu se směnicí č. 7/2019 Univerzity Pardubice "Pravidla pro odevzdání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací".

Rozsah pracovní zprávy: 35 s.
Rozsah grafických prací: dle potřeby
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Markéta Vydřalová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Průkaz vybraných druhů rodu *Capnocytophaga* v zubním plaku 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Bc. Lucie Horká v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Markétě Vydržalové, Ph.D., za odborné vedení, rady, ochotu a vstřícnost, se kterou se mi v průběhu celé diplomové práce věnovala. Dále bych chtěla velmi poděkovat doc. Ing. Lence Husákové, Ph.D., která mi věnovala svůj čas a podala pomocnou ruku při samotném završení diplomové práce. Dík rovněž patří Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D., Ing. Petře Motřkové, Ph.D. a Mgr. Pavlíně Nývltové, Ph.D. za cenné rady. V neposlední řadě bych chtěla také poděkovat své rodině a nejbližším, kteří mě po celou dobu mého studia aktivně a trpělivě podporovali.

ANOTACE

V teoretické části se práce zabývá anatomickým popisem dutiny ústní, její mikrobiální kolonizací a taxonomií bakteriálního rodu *Capnocytophaga*, zohledněna je zde i patologie v dutině ústní, na které se tento rod podílí. Dále jsou v této práci zahrnuty faktory virulence a biochemické vlastnosti rodu *Capnocytophaga*. Závěr teoretické části je zaměřen na laboratorní diagnostiku. Praktická část mapuje průkaz vybraných druhů rodu *Capnocytophaga* prostřednictvím kultivace a metodou polymerázové řetězové reakce, součástí praktické části je i dotazníkové šetření, které se zabývá povědomím veřejnosti o patologiích parodontu a hygieně dutiny ústní.

KLÍČOVÁ SLOVA

gingivitida, parodontitida, *Capnocytophaga*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, PCR

TITLE

Detection of selected species of the genus *Capnocytophaga* in dental plaque

ANNOTATION

The theoretical part of the thesis deals with the anatomical description of the oral cavity, its microbial colonization and taxonomy of the bacterial genus *Capnocytophaga*, the pathology in the oral cavity, in which this genus is involved, is also taken into account. Furthermore, its virulence factors and biochemical properties are included in this work. A chapter focusing on the methods by which this bacterium can be detected is also represented in this work. The practical part maps the attempt to screen selected species of the genus *Capnocytophaga* by culture and molecular biology methods, and the practical part includes a questionnaire survey that addresses public awareness of periodontal pathologies and oral hygiene.

KEY WORDS

gingivitis, periodontitis, *Capnocytophaga*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, PCR

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	14
TERMINOLOGIE	16
ÚVOD.....	18
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	19
1.1 Dutina ústní.....	19
1.2 Fyziologické mikrobiální osídlení dutiny ústní	20
1.3 Ochrana zdraví dutiny ústní.....	22
1.4 Zubní plak a uchycení patogenů	24
1.5 Patologie parodontu	26
1.5.1 Gingivitida	30
1.5.2 Parodontitida.....	31
1.6 Vliv kouření na stav dutiny ústní.....	33
1.7 Kapnofilní bakterie	35
1.8 Rod <i>Capnocytophaga</i>	35
1.8.1 Taxonomie	37
1.8.2 Faktory virulence orálních druhů <i>Capnocytophaga</i>	38
1.8.3 Biochemické testy a citlivost na antibakteriální látky	38
1.8.4 <i>Capnocytophaga gingivalis</i>	40
1.8.5 <i>Capnocytophaga granulosa</i>	41
1.8.6 <i>Capnocytophaga haemolytica</i>	42
1.8.7 <i>Capnocytophaga ochracea</i>	43
1.8.8 <i>Capnocytophaga sputigena</i>	43
1.9 Deoxyribonukleotidová kyselina	45
1.10 Polymerázová řetězová reakce.....	46
1.10.1 Postup metody PCR.....	46

1.10.2	Detekce orálních druhů <i>Capnocytophaga</i> metodou PCR.....	47
1.10.3	Detekce orálních druhů <i>Capnocytophaga</i> metodou real-time PCR.....	50
1.11	Agarózová gelová elektroforéza	51
1.11.1	Průběh agarózové gelové elektroforézy	51
1.12	Polymerázová řetězová reakce s polymorfismem délky restričních fragmentů	53
1.12.1	Polymorfismus délky restričních fragmentů.....	54
1.12.2	Průkaz rodu <i>Capnocytophaga</i> metodou PCR-RFLP	55
1.13	Laserová desorpce/ionizace za účasti matrice s analyzátozem doby letu	57
1.13.1	Průběh identifikace bakterií užitím MALDI-TOF.....	58
1.13.2	Průkaz rodu <i>Capnocytophaga</i> technikou MALDI-TOF.....	59
1.14	Sekvenování.....	59
1.15	16S rRNA	62
1.15.1	Průběh sekvenace 16S rRNA.....	62
1.15.2	Průkaz rodu <i>Capnocytophaga</i> sekvenací 16S rRNA.....	63
1.16	Kultivační průkaz orálních druhů <i>Capnocytophaga</i>	64
2	PRAKTICKÁ ČÁST	67
2.1	Cíl práce	67
2.2	Přístroje a vybavení	68
2.3	Laboratorní pomůcky.....	69
2.4	Kultivační média.....	69
2.5	Reagencie a chemikálie	70
2.6	Referenční kmeny rodu <i>Capnocytophaga</i>	73
2.7	Experimentální část.....	73
2.7.1	Oživení referenčních kmenů.....	73
2.7.2	Odběr vzorku, kultivace, izolace DNA.....	74
2.7.3	Metoda PCR.....	75
2.7.4	Gelová elektroforéza.....	76

3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	77
4	ZÁVĚR.....	111
5	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	114
6	ZDROJE ILUSTRACÍ	127
7	PŘÍLOHA.....	129

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Proces tvorby zubního plaku	25
Obrázek 2 <i>C. gingivalis</i> na KA po 48 h kultivace	40
Obrázek 3 <i>C. granulosa</i> dle Gramova barvení	41
Obrázek 4 Snímek granulí <i>C. granulosa</i> z elektronového mikroskopu.....	42
Obrázek 5 Snímek <i>C. haemolytica</i> z elektronového mikroskopu	42
Obrázek 6 <i>Capnocytophaga sputigena</i> na KA po 48 h kultivace.....	44
Obrázek 7 Schéma PCR reakce	47
Obrázek 8 Příklad elektroforeogramu.....	52
Obrázek 9 Schéma aparatury pro agarózovou elektroforézu	53
Obrázek 10 Schéma PCR-RFLP reakce	55
Obrázek 11 Fotografie naočkovaných referenčních kmenů, nahoře <i>C. sputigena</i> , vlevo <i>C. ochracea</i> , vpravo <i>C. gingivalis</i>	77
Obrázek 13 Fotografie ref. kmenu <i>C. ochracea</i> , barveno dle Grama.....	78
Obrázek 14 Fotografie ref. kmenu <i>C. sputigena</i> , barveno dle Grama	79
Obrázek 15 KA-G se VZ č. 51 (vpravo) a 55 (vlevo), u VZ č. 51 patrný nárůst kolonií s vláknitými okraji.....	80
Obrázek 16 Mikroskopický průkaz přítomnosti <i>Capnocytophaga</i> pomocí Gramova barvení.....	80

Tabulka 1 Klasifikace parodontopatií dle Německé parodontologické společnosti.....	26
Tabulka 2 Nové klasifikační schéma parodontopatií z roku 2017.....	27
Tabulka 3 Taxonomie rodu <i>Capnocytophaga</i>	37
Tabulka 4 Biochemické charakteristiky	39
Tabulka 5 Shrnutí výsledků studie Hayashi et al. z roku 2001.....	49
Tabulka 6 Shrnutí výsledků studie dle Idate et al., z roku 2020.....	57
Tabulka 7 Tabulka přístrojů a vybavení	68
Tabulka 8 Složení modifikovaného krevního agaru	69
Tabulka 9 Složení Brain Heart Infusion Broth	70
Tabulka 10 Seznam použitých primerů	72
Tabulka 11 Využité referenční kmeny.....	73
Tabulka 12 Obecné schéma obsah a objem reagensů pro 1 vzorek (objem 25 µl)	75
Tabulka 13 Podmínky programu PCR reakce dle Suzuki et al., 2010.....	75
Tabulka 14 Výskyt vybraných druhů rodu <i>Capnocytophaga</i>	81
Tabulka 15 Věkové kategorie – výsledky pro <i>Capnocytophaga ochracea</i>	84
Tabulka 16 Věkové kategorie – výsledky pro <i>Capnocytophaga sputigena</i>	85
Tabulka 17 Pohlaví – výsledky pro <i>Capnocytophaga ochracea</i>	86
Tabulka 18 Pohlaví – výsledky pro <i>Capnocytophaga sputigena</i>	87
Tabulka 19 Pravidelnost orální hygieny	88
Tabulka 20 Užívané prostředky pro udržení čistoty dutiny ústní.....	89
Tabulka 21 Čištění dásňových žlábků	89
Tabulka 22 Kuřák/kuřačka.....	90
Tabulka 23 Pojem gingivitida.....	90
Tabulka 24 Pojem parodontitida, resp. parodontóza	91
Tabulka 25 Rozdíl mezi gingivitidou a parodontitidou	91
Tabulka 26 Problémy s onemocněními	92
Tabulka 27 Výskyt zduřelých a červených dásní – výsledky pro <i>Capnocytophaga ochracea</i>	93
Tabulka 28 Výskyt zduřelých a červených dásní – výsledky pro <i>Capnocytophaga sputigena</i>	94
Tabulka 29 Krvácení dásní – výsledky pro <i>Capnocytophaga ochracea</i>	95
Tabulka 30 Krvácení dásní – výsledky pro <i>Capnocytophaga sputigena</i>	96
Tabulka 31 Zápach z úst, halitóza – výsledky pro <i>Capnocytophaga ochracea</i>	97
Tabulka 32 Zápach z úst, halitóza – výsledky pro <i>Capnocytophaga sputigena</i>	98
Tabulka 33 Pocity suchosti v ústech, xerostomie – výsledky pro <i>Capnocytophaga ochracea</i>	99

Tabulka 34 Pocity suchosti v ústech, xerostomie – výsledky pro <i>Capnocytophaga sputigena</i>	100
Tabulka 35 Zvýšená citlivost zubů – výsledek pro <i>Capnocytophaga ochracea</i>	101
Tabulka 36 Zvýšená citlivost zubů – výsledek pro <i>Capnocytophaga sputigena</i>	102
Tabulka 37 Návštěva dentální hygieny.....	103
Tabulka 38 Četnost návštěv	103

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Graf závislosti výskytu <i>Capnocytophaga ochracea</i> na věkových kategoriích	85
Graf 2 Graf závislosti výskytu <i>Capnocytophaga sputigena</i> na věkových kategoriích.....	86
Graf 3 Graf závislosti výskytu <i>Capnocytophaga ochracea</i> na pohlaví	87
Graf 4 Graf závislosti výskytu <i>Capnocytophaga sputigena</i> na pohlaví	87
Graf 5 Graf závislosti výskytu <i>Capnocytophaga ochracea</i> na vizuálním stavu dásní	93
Graf 6 Graf závislosti výskytu <i>Capnocytophaga sputigena</i> na vizuálním stavu dásní	94
Graf 7 Graf závislosti výskytu <i>Capnocytophaga ochracea</i> na krvácení dásní.....	95
Graf 8 Graf závislosti výskytu <i>Capnocytophaga sputigena</i> na krvácení dásní	96
Graf 9 Graf závislosti výskytu <i>Capnocytophaga ochracea</i> na pocitu zápachu z úst	97
Graf 10 Graf závislosti výskytu <i>Capnocytophaga sputigena</i> na pocitu zápachu z úst.....	98
Graf 11 Graf závislosti výskytu <i>Capnocytophaga ochracea</i> na pocitech suchosti v ústech	99
Graf 12 Graf závislosti výskytu <i>Capnocytophaga sputigena</i> na pocitech suchosti v ústech .	100
Graf 13 Graf závislosti výskytu <i>Capnocytophaga ochracea</i> na citlivosti zubů	101
Graf 14 Graf závislosti výskytu <i>Capnocytophaga sputigena</i> na citlivosti zubů.....	102

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ABI – aplikované biosystémy (Applied biosystems)

APC – antigen prezentující buňky (antigen presenting cells)

BHI – Mozko-srdcový bujón (brain heart infusion)

bp – páry bází (base pair)

CCM – česká sbírka mikroorganismů

CHCA – α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)

CO₂ – oxid uhličitý

DNA – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic Acid)

FAA – agar pro rychle rostoucí anaeroby (Fastidious Anaerobes Agar)

GAM – anaerobní médium Gifu, obecné kultivační médium pro kultivaci a izolaci anaerobních bakterií a k testování jejich citlivosti na antibiotika (Gifu Anaerobic Medium)

IgA1 – imunoglobulin A1

KA – krevní agar

MALDI-TOF – laserová desorpce/ionizace za účasti matrice s detektorem doby letu (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization with Time of Flight)

MUNI – Masarykova univerzita

NOD1 – protein 1 obsahující oligomerizační doménu vázající nukleotid (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1)

NOD2 – protein 2 obsahující oligomerizační doménu vázající nukleotid (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2)

PAR – proteázou aktivované receptory (protease activated receptors)

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

RFLP – polymorfismus délky restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)

rRNA – ribozomální ribonukleová kyselina (ribosomal ribonucleic acid)

RTF – redukovaná transportní tekutina, transportní médium (reduced transport fluid)

SMS – sekvenování jedné molekuly (single-molecule sequencing)

SMRT – sekvenování v reálném čase s jednou molekulou (single-molecule real-time sequencing)

TBBP – médium obsahující 4% tryptikázový sójový agar, 5 % ovčí krve, 0,1 % kvasinkového extraktu, 50 µg/ml bacitracinu a 100 µg/ml polymyxinu B

TBE – pufr Tris-borát-EDTA

TLR – toll-like receptor

TOF – analyzátor doby letu (Time of flight)

ZMW – vlnovody s nulovým režimem (zero-mode waveguide)

TERMINOLOGIE

Adherence – přilnavost

Agregace – seskupování, shlukování

Amplifikovat – zmnožit

Amplikon – produkt zmnožení

Bukální – ze strany tváře, týká se tváře a sliznice

DNA polymeráza – enzym účastnící se zdvojení DNA, vkládáním nových nukleotidů prodlužuje řetězec

Epiglottis – hrtanová příklopka

Exsudace – průnik tekutiny z cév při jejich větší propustnosti, zánětlivý výpotek

Foetor ex ore – zápach z úst

Fusiforní – vřetenovitý

Gramnegativní bakterie – bakterie s buněčnou stěnou tvořenou tenkou vrstvou peptidoglykanu a vrstvou lipopolysacharidu

Hybridizace – metoda umožňující lokalizaci a identifikaci specifické sekvence nukleotidů v nukleové kyselině

Chemiluminiscence – světélkování způsobené energií, která se uvolnila při chemické reakci

Imunokompromitovaný – mající poškozeny či oslabený imunitní systém

Interproximální – oblast mezi dvěma zuby

Kapnofilní – využívající pro svůj růst oxid uhličitý

Kariogenní – schopný vytvářet zubní kaz

Lamina propria – tenká vrstva pojiva vytvářející část sliznice

Léze – poškozená tkáň

Mandibula – dolní čelist

Marginální – hraniční, okrajový

Mikrobiota – mikroorganismy

Mitogeny – látka navozující mitózu

Mukozitida – zánětlivé onemocnění sliznice dutiny ústní

Mylohyoidální sval – jazykočelistní sval, zdvihá jazyku a umožní pokles dolní čelisti

Nika – specifické prostředí s živinami pro daný organismus

Orofarynx – část hltanu za dutinou ústní

Parodont – závěsný aparát zubu, tkáň obklopující a fixující zub na svém místě

Parodontální choboty – parodontální kapsy způsobené odtlačení gingivy od zubu

Patogen – biologický faktor, který může zapříčinit onemocnění hostitele

PCR – polymerázová řetězová reakce, dochází k rychlému zmnožení úseku DNA

Polymorfonukleární – mnohojaderný

Real-time PCR – PCR v reálném čase

Redundantní – nadbytečné množství

Replikace DNA – proces tvorby kopií DNA

Sekvence – souhrnný termín pro metody umožňující specifikovat pořadí nukleotidů v daném úseku DNA

Sublingvální – podjazyková

Submandibulární – podčelistní

Sulkus/sulcus – žlábek

Templát – matrice, vzor pro tvorbu kopií nových nukleových kyselin

Termocykler – přístroj pro průběh PCR reakce, mění teplotu v požadovaných intervalech

Ulcerace – vznik vředu, zvrhodování

ÚVOD

Dutina ústní je osídlena velkým množstvím mikroorganismů, které za přirozeného stavu kooperují s hostitelem na principu komenzalismu. Znamená to tedy, že jedna strana má z této vzájemné spolupráce užitek a druhá není nikterak ovlivněna. Ve chvíli, kdy je vychýlena rovnováha a nastává dysbióza, dochází ke změnám v zastoupení ústní mikroflóry, a to může mít negativní dopady na hostitele. Oportunní patogeny, kupříkladu bakterie rodu *Capnocytophaga*, mohou ve chvíli, kdy pro organismus neplatí fyziologický stav či nefunguje zcela správně imunitní systém, tuto situaci využít ve svůj prospěch. S tím souvisí nejprve lokální obtíže jako např. zubní kaz či parodontitida, posléze však mohou tyto bakterie proniknout do krevního řečiště a způsobit komplikace po operačních výkonech, které neznáma mohou končit fatálně. Pro udržení zdraví nejen dutiny ústní, ale i celého organismu, je nutné pravidelně a správně provádět orální hygienu. Kvalitou a technikou čištění či výběrem vhodných pomůcek se v současné době zabývá obor dentální hygiena, která v naší populaci postupně nabývá významného postavení.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Dutina ústní

Dutina ústní, lat. *cavitas oris*, se anatomicky dělí na předsíň dutiny ústní a vlastní dutinu ústní. Prostor předsíně je z vnější strany ohraničen rty a tvářemi (Čihák a Grim, 2013, s. 16) a ze spodní části ji ohraničuje mylohyoidální sval (Famuyide et al., 2022, s. 1). Z vnitřní části je dutina ústní tvořena dásněmi a zuby. Za zubními oblouky se nachází vlastní dutina ústní obsahující svalové dno, kde je uložen jazyk, lat. *lingua*. Vrchní část dutiny ústní je tvořena tvrdým a měkkým patrem, lat. *palatum durum* a *palatum molle*, které od sebe dělí dutinu ústní a dutinu nosní (Mazánek et al., 2018a, s. 28). Patrová mandle, která se nachází v zadní části dutiny ústní, lat. *tonsilla palatina*, je útvar okrouhlého tvaru a na základě své funkce se řadí mezi sekundární lymfatické orgány. Dutinu ústní tvoří sliznice nasedající na podslizniční vazivo, povrch sliznice tvoří vrstevnatý dlaždicový epitel (Čihák a Grim, 2013, s. 16). Tento epitel se skládá z bazálních, polyedrických a plochých povrchových buněk. Převážnou část dutiny ústní tvoří zuby, jenž vyrůstají z dásní a jazyk upínající se na jazyčku. Jazyk je podkovovitá kost mezi bradou a hrtanem pojící se pomocí vazů s bází lebeční (Mazánek et al., 2018a, s. 28).

Jazyk je svalový orgán, který pokrývá mnohvrstevný dlaždicový epitel obsahující výběžky, tyto výběžky nazýváme papily (Vilímovský, 2019, s. 1). Jeho primární funkcí je tvorba řeči, schopnost artikulace, polykání a zejména možnost vnímání chuťových vjemů (Famuyide et al., 2022, s. 2). Díky procesu vývoje, zvanému evoluce, jsme jako lidé schopni rozeznávat celkem 5 základních chutí – sladká, slaná, hořká, kyselá a chuť umami (Kalinová, 2006, s. 2). Nejvíce chuťových receptorů se nachází na jazyku, především v rýhách tzv. hrazených papil a v postranních stěnách papil listovitých a houbovitých. Chuťové pohárky, díky nimž můžeme vnímat chuť, se nachází i ve sliznicích měkkého patra, na patrových obloucích, na zadní části hltanu, na epiglottis a dokonce i v hrtanu (Mazánek et al., 2018a, s. 56). Dutina ústní zároveň oplývá velkým množstvím slinných žláz a žlázek ve slizničním vazivu mezi něž patří tři párové hlavní slinné žlázy (příušní, submandibulární a sublingvální) (Famuyide et al., 2022, s. 1).

1.2 Fyziologické mikrobiální osídlení dutiny ústní

Dutina ústní člověka je komplexní ekosystém (Handfield et al., 2008, s. 1), ve kterém se nachází mnoho druhů mikroorganismů (Slezák et al., 1997, s. 17). Povrch zubu podporuje vývoj a zrání komplexního biofilmu, ústní mikrobiom obsahuje tedy více než 700 bakteriálních druhů, dále viry, houby a minoritně prvoky (Santacroce et al., 2023, s. 1288).

Orální mikrobiota hraje důležitou roli pro zdraví celého lidského těla. Jednotlivé mikroorganismy interagují navzájem mezi sebou a hostitelem, pokud je tato interakce v rovnováze, nazýváme ji tzv. eubióza. Avšak v případě, že dojde jakýmkoliv způsobem k jejímu narušení, jedná se o dysbiózu, která může být způsobena např. stravou, špatnou ústní hygienou, kouřením, léky, těhotenstvím ale i genetickou predispozicí (Santacroce et al., 2023, s. 1288). Z hlediska stravy prospěšné pro orální zdraví se doporučuje konzumovat potraviny obsahující větší množství vlákniny a mléčné výrobky. Strava bohatá na cukr bývá spojována se zvýšenou přítomností *Streptococcus mutans* a *Fusobacterium nucleatum*. V případě kouření dochází k osídlení dutiny ústní i takovými bakteriálními druhy jako jsou *Bacillus* spp. a *Clostridium* spp. Proces kouření zahrnuje navíc i negativní ovlivnění chemické povahy slin, konkrétně jejich okyselení a tím dochází ke snížení obsahu kyslíku v dutině ústní. Důsledkem je tedy zvýšený rozvoj anaerobních bakterií na úkor aerobních (Santacroce et al., 2023, s. 1289).

Osídlení dutiny ústní bakteriemi je přirozená součást života. Některé druhy bakterií mají v povaze se navzájem shlukovat a vytvářet biofilm, v případě dutiny ústní a zubů se jedná o tzv. zubní plak. Biofilmem je myšlena skupina mikroorganismů vázaná na určitý povrch. V mikrobiologii se jedná o přilnavou vrstvu mikrobů složenou z živých i mrtvých bakterií a jejich produktů překrytých extracelulární matrix. Matrix tvoří mikrobiální polysacharidy, bílkoviny a anorganické složky (Votava et al., 2007, s. 466, 474–475). Pravděpodobně nejdůkladněji charakterizovanými polymery biofilmové matrice v zubním plaku jsou glukanové a fruktanové polysacharidy, které jsou produkovány působením enzymů extracelulární glukosyltransferasy a fruktosyltransferasy na sacharózu. Právě tyto polysacharidy jsou považovány za důležité faktory virulence při tvorbě zubního kazu (Jakubovics et al., 2021, s. 2). Postupem času se bakteriální spektrum plaku mění a narůstá jeho síla, na povrchu plaku se nacházejí aerobní bakterie, hlouběji pak bakterie anaerobní (Mazánek et al., 2018a, s. 120). Při nedostatečném a nepravidelném odstraňování tohoto biofilmu dochází v dutině ústní k rozvoji patologií spojených s vážnějšími onemocněními parodontu, z nichž lze jmenovat např. gingivitidu či parodontitidu (Votava et al., 2007, s. 466, 474–475).

Skladba zubního plaku závisí na místě vzniku, délce trvání a dalších faktorech. Na základě doby setrvání plaku se v dutině ústní začínají objevovat trvale se vyskytující mikroorganismy (rezidentní) a příležitostně se vyskytující mikroorganismy (tranzientní) (Votava et al., 2007, s. 466). V dutině ústní, resp. na bukalní sliznici lze nalézt zejména fakultativně anaerobní *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Haemophilus parainfluenzae* a aerobní ústní neisserie (Slezák et al., 1997, s. 17–18). Toto mikrobiální osídlení je na rozdíl od jazyka poněkud skromné, je to dáno poměrně rychlou obměnou povrchových vrstev sliznice a epitelii. Přisedlé mikroorganismy se postupně odlupují a odcházejí pryč. Mezi jednotlivými papilami jazyka mnohdy zůstávají odloupané kusy epitelii a v důsledku toho se na jazyku nachází mnohem více mikrobů než na bukalní sliznici. Kromě *Streptococcus sanguis*, který se vyskytuje dominantně, jsou na jazyku přítomny i *Streptococcus salivarius*, *Rothia mucilaginosa*, *Neisseria* sp. (převážně u malých dětí) a rody *Haemophilus*, *Actinomyces* a *Prevotella*. Mezi papilami se rovněž nachází ideální prostředí pro anaerobní mikroorganismy, a to vlivem nízkého redox potenciálu (Votava et al., 2007, s. 466). Jako příklad anaerobů lze uvést hojně se vyskytující rody *Actinomyces*, *Arachnia*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, a *Veillonella* (Slezák et al., 1997, s. 17–18).

Výzkumy prokázaly, že během prvních měsíců těhotenství se v gingiválním sulku plodu vyskytují ve zvýšeném množství převážně *Porphyromonas gingivalis* a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, zatímco v posledním trimestru převládá spíše rod *Candida*. Dále se zde nacházejí *Capnocytophaga sputigena*, *Eubacterium sabburreum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis* a mnohé další (Santacroce et al., 2023, s. 1289).

Mateřské mléko hraje rovněž důležitou roli při formování mikroflóry dutiny ústní, neboť kojencům se orální mikrobiální složení pravidelně obměňuje. Nejčastějšími zástupci v dutině ústní kojenců jsou rody *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas*, *Bradyrhizobiaceae* a *Ralstonia* (Sampaio-Maia et al., 2016, s. 5).

Mikroorganismy vyskytující se výhradně v dutině ústní, jsou označovány jako tzv. mikroorganismy autochtonní. Mezi tyto mikroorganismy se řadí některé aktinomycey, bakteroidy a případně spirochety (Slezák et al., 1997, s. 17–18). Vzhledem k tomu, že fyziologický stav je nejčastějším stavem organismu, vyvstaly v dřívějších letech spekulace o společném vývoji této autochtonní mikrobiální flóry a hostitele a jejich vyváženém způsobu

kooperace, který by byl prospěšný pro hostitele i pro mikrobiotu. Tyto přínosy nejsou dosud v rámci dutiny ústní zcela přesně definovány, na rozdíl od gastrointestinálního traktu, kde je zdokumentováno mnoho přínosů pro hostitele. Jedná se tedy ku příkladu o tvorbu zjednodušených sacharidů, aminokyselin a vitamínů, prevence infekce patogeny přímou kompeticí o niky, stimulace vaskularizace a vývoje střevních klků a posílení normálního imunitního systému (Handfield et al., 2008, s. 2).

Etiologie orálních infekčních onemocnění je poněkud složitá a zahrnuje mnoho druhů bakterií pracujících v jakési shodě s imunologickou citlivostí hostitele. Kolonizace subgingivální oblasti závisí zpočátku na rozšíření biofilmu supragingiválního plaku pod linii dásně, tím se z něj stává tzv. subgingivální plak. Tato oblast je méně okysličená, což je rovněž způsobeno metabolickou aktivitou počátečních kolonizátorů, streptokoků. Jejich metabolická aktivita snižuje množství kyslíku a umožňuje tak přežití anaerobů. Převládajícím anaerobním druhem v subgingiválním plaku je *Fusobacterium nucleatum*, který se vyskytuje ve zralém plaku dutiny ústní zdravého i nemocného jedince. Jeho přítomnost společně se *Streptococcus gordonii* podporuje kolonizaci pozdějšímu, více patogennímu *Porphyromonas gingivalis*, který hraje významnou roli v iniciaci a progresi chronické parodontitidy (Handfield et al., 2008, s. 2).

1.3 Ochrana zdraví dutiny ústní

Obranný systém dutiny ústní je v ochraně před působením patogenních mikroorganismů velmi specifický. Spočívá ve víceúrovňovém uspořádání podobném imunitnímu systému kůže (Slezák et al., 1997, s. 21). Neporušená sliznice úst se skládá ze 2 vrstev – vrstevnatého dlaždicového epitelu, který brání průniku patogenních mikroorganismů, a lamina propria (Groeger a Meyle, 2019, s. 2). Sliznice dutiny ústní a dalších částí trávicího systému jsou kryty mucinem. Jedná se o glykoprotein, který chrání epitel a zajišťuje správnou kluzkost sliznice, mucin zároveň umožňuje vázat a agregovat mikroorganismy, což má za následek inhibici jejich adherence a kolonizace. Mezi další obranné mechanismy podílející se na ochraně dutiny ústní patří např. obměna epitelu rohovatějících i nerohovatějících oblastí dutiny ústní, sliny a jejich produkce a slinné glykoproteiny (Lynge Pedersen a Belstrøm, 2019, s. 3). Celkem rozeznáváme 4 vrstvy zrohovatělé sliznice dutiny ústní, jsou jimi stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, a stratum corneum (Groeger a Meyle, 2019, s. 2). Imunitní systém člověka pracuje na kooperaci specifických a nespecifických imunitních reakcí, které zajišťují mechanismy buněčné a protilátkové imunity (Slezák et al., 1997, s. 21). V dutině ústní probíhají nespecifické

obránné reakce např. pomocí enzymů slin, konkrétně se může jednat o enzymy lysozym, laktoferin (Slezák et al., 1997, s. 22), laktoperoxidáza (Magacz et al., 2019, s. 1), statherin a histatiny. Lysozym je enzym proteinové povahy působící účinně proti grampozitivním bakteriím. Enzym laktoferin je svojí povahou glykoprotein, který má schopnost vyvazovat volné ionty železa, které jsou nutné pro růst bakterií (Slezák et al., 1997, s. 22). Glykopeptid laktoperoxidáza je klíčový v boji s onemocněním zvané parodontitida. Laktoperoxidáza bývá vylučována epitelovými buňkami acinu v podčelistních a příušních slinných žlázách, princip mechanismu působení spočívá v oxidaci thiokyanátových iontů (rovněž jodidů a bromidů) na hypothiokyanitové ionty (hypoiodidy a hypobromidy) za využití peroxidu vodíku. Hypothiokyanitové ionty mají schopnost oxidovat thiolové skupiny aminokyselinových zbytků mikrobiálních proteinů. Tato skutečnost vede k jejich zhoršené funkci, a to má za následek inhibici buněčného dělení či smrt mikroorganismu (Magacz et al., 2019, s. 1). Statherin je kyselý slinný peptid s vysokým obsahem tyrosinu a bývá vylučován acinárními buňkami příušních a submandibulárních slinných žláz (Pateel et al., 2022, s. 84–85). Inhibuje precipitaci vápníku a fosfátu a tím reguluje remineralizaci skloviny (Abíková a Urbanová, 2017, s. 36). Histatiny jsou kationtové peptidy, které se snadno absorbují na hydroxyapatit, čímž přispívají k tvorbě získané pelikuly skloviny. To hraje významnou roli při bakteriální kolonizaci povrchu zubů. Všechny tři hlavní lidské histatiny – histatin 1, histatin 3 a histatin 5 vykazují antifungální aktivitu vůči *Candida albicans*, histatin 5 bývá označován za nejúčinnější. Histatiny rovněž vykazují antibakteriální a antivirové vlastnosti (Lynge Pedersen a Belstrøm, 2019, s. 6). Murakami et al. ve své studii z roku 1990 uvedli, že histatiny inhibují hemaglutinaci *Porphyromonas gingivalis*, to má za následek potlačení kolonizace dutiny ústní tímto patogenem (Abíková a Urbanová, 2017, s. 36).

Buněčná složka nespecifické imunity zahrnuje např. fagocytózu opsonizovaných cizorodých antigenů pomocí polymorfonukleárních leukocytů, tkáňových makrofágů a Langerhansových buněk. Tkáňové makrofágy jsou kromě toho i antigen-prezentujícími buňkami (APC) a předávají T-lymfocytům potřebné informace pro pozdější zahájení specifických imunitních dějů. Na nespecifických obranných dějích se podílejí také žírné buňky (mastocyty), které obsahují velké množství biologicky aktivních látek (Slezák et al., 1997, s. 22). Imunitní odpověď tkáně dutiny ústní umožňuje rozpoznat mikrobiální infekci prostřednictvím epiteliálních buněk, které na svém povrchu vystavují řadu receptorů pro rozpoznávání nebezpečných vzorů. Mezi tyto receptory můžeme počítat např. TLR, NOD1, NOD2, PAR. Dále umožňují vystavovat na svém povrchu řadu prozánětlivých cytokinů

a chemokinů, které přilákají do místa infekce nejprve složky nespecifické imunity a následně i složky specifické imunity (Groeger a Meyle, 2019, s. 15). Na obraně sliznice dutiny ústní se podílejí NK buňky, které mají za úkol ničit cizorodé antigeny bez předešlého rozpoznání imunitním systémem. Buněčnou složku specifické imunity zaujímají intraepiteliální cytotoxické T-lymfocyty (Slezák et al., 1997, s. 23).

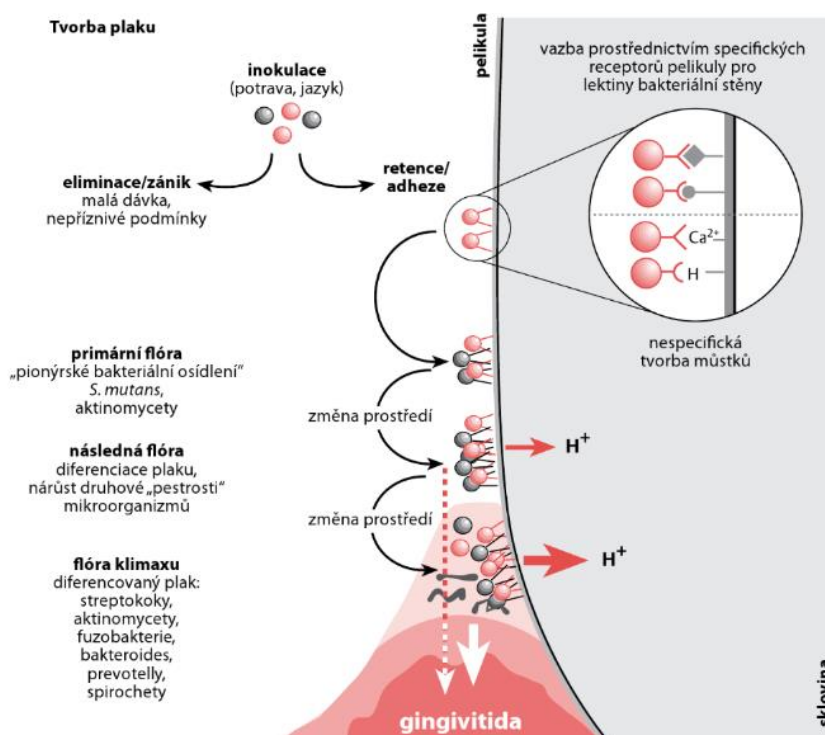
Epitelové buňky jsou neustále ovlivňovány rezidentními ústními bakteriemi, které mají společně s biofilmem, v závislosti na jeho skladbě, výrazný vliv na obranyschopnost hostitele. Imunitní systém chrání hostitele proti patogenním bakteriím, v případě že množství těchto bakterií převyší kapacitu imunitního systému, dojde následně k průniku těchto patogenů do parodontu (Groeger a Meyle, 2019, s. 15). To je poté důvodem pro případnou medikamentózní léčbu v podobě podání antibiotik nebo využití lokálně působících antiseptik (Slezák et al., 1997, s. 18).

1.4 Zubní plak a uchycení patogenů

Zubním plakem, jak bylo zmíněno již výše, je myšlena přilnavá vrstva živých a mrtvých mikroorganismů. Na tvorbě zubního plaku se rovněž podílí i produkty těchto mikroorganismů a společně dohromady tedy vytváří tzv. mikrobiální film (Votava et al., 2007, s. 475). Jedná se o povlak nažloutlé barvy, pevně ulpívající, strukturovaný a vysoce organizovaný (Weber, 2012, s. 43). Zahrnuje přibližně 500 bakteriálních druhů, které kolonizují dutinu ústní regulovaným způsobem. Adheze primárních kolonizátorů na zubní sklovinu je doprovázena interbakteriální adhezí sekundárních kolonizátorů. Různorodost molekulárních interakcí je umožněna adhezivními interakcemi zapojenými do vývoje plaku. Postupný vývoj neodstraněného plaku může vést k patologiím, jako jsou např. zubní kaz (Gasmi Benahmed et al., 2021, s. 135), gingivitida, parodontitida (Hong et al., 2016, s. 60) a další jiná parodontální onemocnění (Gasmi Benahmed et al., 2021, s. 135). Dle místa výskytu můžeme rozdělit zubní plak na supragingivální a subgingivální, vzájemně se od sebe liší stavbou a zastoupením mikrobu (Votava et al., 2007, s. 475).

Asma Gasmi Benahmed et al. ve svém článku z roku 2021 uvádějí existenci ještě dalších druhů zubních plaků jako jsou plak molární, incizální a plak získaný z lingválních, bukálních a interproximálních povrchů. Uvádí, že se jedná o neustále se měnící ekologickou jednotku, která je interpretována na základě pozorování skupiny bakteriálního biofilmu. Skupina bakteriálního biofilmu se skládá z různých bakteriálních druhů a je charakteristická přisedlým růstem na biologicky aktivních površích (Gasmi Benahmed et al., 2021, s. 135). Pro vznik

a přežití bakterie v hostitelském prostředí je v mnoha případech zásadní její adherence k povrchu tkáně. Parodontální kapsa (parodontální chobot) je jedinečná tím, že obsahuje 4 typy kolonizačních povrchů: cement a dentin (mineralizované tkáně), orální sulkulární epitel (keratinizovaný epitel) a rovněž také povrchy samotných eubakterií. Do parodontální kapsy mají přístup všechny druhy, které pronikají do ústní dutiny nebo jí pouze procházejí. V tomto prostředí však přežívají výhradně ty eubakterie, které jsou schopny výše zmíněné povrchy úspěšně kolonizovat. K adhezi na tyto povrchy obvykle, ale ne vždy, dochází interakcí tenkých povrchových výběžků se specifickými receptory hostitele, fimbrie a kapsuly. Invazivní bakterie má také ve své povrchové vrstvě vyvinuté komplexní makromolekuly, které hrají aktivní roli v procesu infekce. Mezi tyto makromolekuly se řadí např.: lipopolysacharidy, proteiny asociované s vnější membránou, enzymatické molekuly, toxiny a bakteriociny (Holt a Bramanti, 1991, s. 177–179).



Obrázek 1 Proces tvorby zubního plaku, převzato od Weber, 2012, s. 43, upraveno

1.5 Patologie parodontu

Nejčastěji vyskytujícími se infekčními onemocněními parodontu, které trápí vysoké procento populace i v mladším věku, jsou gingivitida a parodontitida. Americká asociace pro dentální výzkum ve svém FY2003 Fact Sheet uvedla, že 48 % dospělých ve věkovém rozmezí 35–44 let trpí zánětem dásní (gingivitidou) a 22 % dospělých osob trpí destruktivním parodontálním onemocněním, které je mimo jiné hlavní příčinou ztráty zubů. Nové výzkumy dokazují, že chronická parodontální onemocnění jsou navzájem propojena i s hlavními systémovými onemocněními jako jsou kardiovaskulární či plicní onemocnění. Pro rozvoj parodontitidy a gingivitidy je nutná součinnost jednotlivých druhů bakterií, nicméně je známo že nikoliv pouhé působení bakterií vede k rozvoji tohoto onemocnění, ale celý proces stojí na jakési multifaktoriální etiologii (Nanci a Bosshardt, 2000, s. 23).

V knize Záchovná stomatologie a parodontologie od Hellwig et al. z roku 2003 uvádějí následující klasifikaci marginálních parodontopatií dle Německé parodontologické společnosti z roku 1988:

Tabulka 1 Klasifikace parodontopatií dle Německé parodontologické společnosti

Zánětlivé formy
Gingivitida <ul style="list-style-type: none">a) Akutní gingivitidab) Akutní nekrotizující ulcerózní gingivitida (ANUG)c) Chronická gingivitida
Marginální parodontitida <ul style="list-style-type: none">d) Parodontitis marginalis superficialise) Parodontitis profundaf) Lokalizovaná juvenilní parodontitida (LJP)g) Rychle progredující parodontitida (RPP)h) Pomalu progredující parodontitida (AP)
Gingivo-parodontální manifestace systémových onemocnění
Hyperplastické formy
Epulidy Fibrózní hyperplazie gingivy <ul style="list-style-type: none">i) Idiopatická fibrózní hyperplazie gingivyj) Medikamentózně podmíněná fibróza

k) Hyperplazie gingivy
Traumatické formy
Poranění gingivy Desmodontální trauma
Involuční formy
Atrofie alveolu Recesy gingivy l) Singulární recesy (solitární, izolované) m) Generalizované recesy

Zdroj: vlastní zpracování dle (Hellwig et al., 2003)

Toto rozdělení bylo později překlasifikováno v roce 1999 a v roce 2017 bylo vydáno opět nové klasifikační schéma shrnující správnou klasifikaci, diagnostiku a léčbu pacientů s parodontopatiemi.

Tabulka 2 Nové klasifikační schéma parodontopatií z roku 2017

ONEMOCNĚNÍ A STAVY PARODONTU
Zdravý parodont a onemocnění gingivy
Zdravý parodont <ul style="list-style-type: none"> a) zdravá gingiva u neredukovaného parodontu b) zdravá gingiva u redukováného parodontu <ul style="list-style-type: none"> - pacient se stabilní parodontitidou - pacient bez parodontitidy
Plakem podmíněná gingivitis <ul style="list-style-type: none"> - asociovaná pouze se zubním plakem - modifikovaná systémovými nebo lokálními rizikovými faktory - zvětšení dásní indukované léky (hyperplazie)
Onemocnění gingivy neindukované plakem <ul style="list-style-type: none"> - genetické/vývojové poruchy - specifické infekce - zánětlivé nebo imunitní stavy a léze - reaktivní procesy

- novotvary
- endokrinní, nutriční a metabolické choroby
- traumatické léze
- pigmentace dásní

Parodontitida

Nekrotizující parodontální onemocnění

- nekrotizující gingivitida
- nekrotizující parodontitida
- nekrotizující stomatitida

Parodontitida

- a) Stádia: založená na úrovni mezizubního úponu v místě s největší ztrátou a na hloubce sondáže, charakteru úbytku kosti, furkační lézi, počtu zbývajících zubů, pohyblivost zubů, defektů hřebene a poruch žvýkání
 - stádium I: iniciální parodontitida (časná)
 - stádium II: středně pokročilá parodontitida
 - stádium III: pokročilá parodontitida s rizikem další ztráty zubu
 - stádium IV: pokročilá parodontitida s rizikem ztráty chrupu
- b) Rozsah a lokalizace: lokalizovaná, generalizovaná, molárovo-řezáková oblast
- c) Stupně: důkaz úbytku kosti vzhledem k věku, kazuistiky, kuřáci, diabetes
 - Stupeň A: pomalá progresse
 - žádný úbytek kosti či ztráta attachmentu za 5 let
 - nánosy plaku s malou destrukcí
 - % úbytek kosti/věk je méně než 0,25
 - Stupeň B: středně rychlá progresse
 - úbytek kosti či ztráta attachmentu je méně než 2 mm za 5 let
 - destrukce úměrná množství plaku
 - % úbytek kosti/věk je v rozmezí 0,25 – 1,0
 - Stupeň C: rychle progredující
 - úbytek kosti či ztráta attachmentu je větší než 2 mm za 5 let
 - poškození tkáně převyšuje očekávání pro dané množství plaku; postižena je oblast molárů a řezáků a slabá reakce na běžnou terapii
 - období rychlé progresse
 - % úbytek kosti/věk je větší než 1,0

Parodontitida jako projev systémových onemocnění (*klasifikace tohoto stavu by měla být založena na primárním systémovém onemocnění dle kódů Mezinárodní klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů*)

Parodontální projevy systémových onemocnění, vrozené a získané změny parodontu

Systémové onemocnění a jiné stavy ovlivňující podpůrné tkáně parodontu

Parodontální absces a pulpo-parodontální léze

Parodontální abscesy

- u pacientů s parodontitidou (parodontální choboty již přítomny)
 - akutní exacerbace
 - neléčená parodontitida
 - parodontitida nereagující na léčbu
 - podpůrná terapie parodontitidy
 - po terapii
 - po subgingiválním ošetření
 - po lalokové operaci
 - po medikaci – ATB celkově bez subgingiválního ošetření a další
- u pacientů bez parodontitidy
 - cizí těleso – zubní nit, párátko, slupka potravin
 - zlozvyky – okusování předmětů
 - ortodontické faktory – ortodontické síly či zkřížený skus
 - hyperplazie gingivy
 - poškození/změny povrchu kořene
 - závažné anatomické odchylky – invaginace, odontodysplazie
 - menší anatomické odchylky – sklovinné perly, rýhy
 - iatrogenní defekty – perforace
 - závažná poškození kořene – podélná fraktura kořene
 - externí cervikální resorpce

Mukogingivální deformity a stavy

- fenotyp gingivy
- recese gingivy/měkkých tkání
- nedostatek gingivy
- mělké vestibulum
- tah slizničních řas nebo úpon svalů

<ul style="list-style-type: none"> - zbytnění gingivy - abnormální barva - odhalený povrchu kořene zubu
<p>Traumatická artikulace</p> <ul style="list-style-type: none"> - primární traumatická artikulace - sekundární traumatická artikulace - ortodontické síly
<p>Faktory spojené se zubem a zubní náhradou</p> <ul style="list-style-type: none"> - lokalizované faktory související se zubem - lokalizované faktory související se zubní náhradou

Zdroj: vlastní zpracování dle (LKS – Recenzovaný časopis České stomatologické komory, 2019)

1.5.1 Gingivitida

Gingivitida je zánětlivé onemocnění dásní způsobené nejčastěji bakteriální infekcí. Tento zánět se omezuje na měkké tkáně dásňového epitelu a pojivové tkáně (Manu a Prachi, 2023, s. 1), netýká se však zubního aparátu či parodontálních vazů (Erpenstein, 2002, s. 145). Gingivitida bývá uváděna jako nejčastější typ parodontálního onemocnění. Existují různé formy tohoto zánětu, a to v závislosti na klinickém vzhledu, trvání infekce, závažnosti a etiologii. Vzniká působením mikrobiálního plaku umístěného v gingiválním sulku (dásňovém žlábků) či v jeho bezprostřední blízkosti (Manu a Prachi, 2023, s. 1). V případě, že tento mikrobiální zubní plak není dokonale odstraněn, celkové množství mikrobů rychle roste a převahu začnou mít agresivní kokovité a tyčinkovité bakterie, případně i další druhy. Tyto bakterie vylučují toxické produkty látkové výměny, jenž pronikají skrze epitel ve žlábků do tkáně. Toxické produkty látkové výměny následně organismus rozpoznává jako cizí antigeny, a to vede k zánětlivé obranné reakci organismu. Tato reakce spočívá ve vasodilataci, která může způsobit otok dásní vlivem hlubšího průniku toxických látek (Slezáková et al., 2016, s. 1078–1079).

Klinickým projevem tohoto onemocnění jsou zarudlé a zduřelé dásně, případně výskyt ulcerací. Objevuje se i zvýšené množství sulkulární tekutiny (exsudace), krvácení po sondáži či krvácení způsobené mechanickým podnětem a přítomnost tzv. nepravých parodontálních chobotů. Nepravé parodontální choboty jsou zvětšené gingivální sulky se současně neporušeným dentogingiválním spojením (Morozova, 2016, s. 60). Gingivitida nebývá příliš

bolestivou záležitostí, a proto mnoho pacientů toto onemocnění nerozpozná (Manu a Prachi, 2023, s. 1). V případě výskytu tohoto onemocnění, nevyhledání lékařské pomoci a následnému neléčení dochází až v polovině případů k přechodu tohoto onemocnění v závažnější formu patologie parodontu, a to v tzv. parodontitidu (Dostálová a Beznosková Seydlová, 2008, s. 92). Mezi mikroorganismy, které jsou silněji spojené se vznikem gingivitidy patří rody *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Veillonella* a *Treponema*. Rody *Capnocytophaga*, *Bacteroides* a *Eikenella* jsou rovněž potenciálními patogeny podílející se na vzniku gingivitidy (Manu a Prachi, 2023, s. 3).

Z hlediska etiologie lze gingivitidu rozdělit na tyto druhy: gingivitida indukovaná plakem, gingivitida způsobená hormonálními změnami, gingivitida způsobená malnutricí a léky indukovaná gingivitida (kontracetivy vyvolaná gingivitida) (Manu a Prachi, 2023, s. 4). Forma gingivitidy, která dominuje napříč klasifikacemi, je plakem indukovaná gingivitida. Statistické údaje dokládají, že až u 90 % obyvatel střední Evropy je možné potvrdit výskyt chronické plakem indukované gingivitidy. Tuto formu lze zároveň označit za nejčastěji vyskytující se zánět lidského těla. Zánět dásní způsobený jinou příčinou než plakem, se vyskytuje zřídka, jedním z příkladů je gingivitida vyvolaná na základě specifických bakteriálních, virových ev. kvasinkových infekcí jako jsou syfilis, kapavka, HIV a herpes. (Rosenbaum, 2015, s. 1).

Odstraněním zubního plaku a dodržováním vhodných hygienických postupů, může být gingivitida během několika dní potlačena, neboť se jedná o reverzibilní stav (Slezáková et al., 2016, s. 1078–1079). Pokud však zánět dásní přejde v parodontitidu a dojde tak ke ztrátě úponu (attachementu) pojivové tkáně, případně destrukci kosti, může to vést až ke ztrátě zubu (Manu a Prachi, 2023, s. 5).

1.5.2 Parodontitida

Parodontitida je chronické multifaktoriální zánětlivé onemocnění spojené s dysbiotickými biofilmy plaku (Papapanou et al., 2018, s. 174). Parodontitida bývá charakterizována progresivním a ireverzibilním poškozením všech tkání parodontu (dásně, zubního cementu, alveolární kosti a parodontálních vazů) (PR, Johnson & Johnson, s. r. o., 2015, s. 27). Mezi její primární rysy patří ztráta podpory parodontální tkáně, která se projevuje klinickou ztrátou úponu (CAL) a radiograficky stanoveným úbytkem alveolární kosti. Mezi další znaky patří přítomnost parodontálních kapes (chobotů) a krvácení dásní (Papapanou et al., 2018, s. 174). Za onemocnění závěsného aparátu zodpovídají, tzv. parodontální patogeny,

které se v menším množství vyskytují i u zdravého jedince (PR, Johnson & Johnson, s. r. o., 2015, s. 27). Mezi pravděpodobné parodontální patogeny se řadí *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Eubacterium* sp., *Selenomonas* sp., *Veillonella parvula*, a spirochety jako např. *Treponema denticola* (Hellwig et al., 2003, s. 250). Parodontální kapsa je největším zdrojem bakterií, jejich virulentních faktorů a toxinů (Straka, 2014, s. 15). Mimo výše uvedené příznaky je možno také evidovat zvýšenou pohyblivost zubů, foetor ex ore, hnisavé exsudace z chobotů a obnažování povrchu zubního kořene. Tyto příznaky jsou spíše minoritního charakteru, dále závisí na formě a závažnosti onemocnění, na přítomnosti dalších chorobných stavů či na koincidenci s různými systémovými onemocněními (Dostálová a Beznosková Seydlová, 2008, s. 92). Parodontitida je jedním z nejčastěji se vyskytujících onemocnění, a to kvůli své vysoké prevalenci (Papapanou et al., 2018, s. 1), u dospělého člověka dosahuje tato prevalence 70–80 % (Votava, 2007, s. 486–487). Změny v rámci tohoto onemocnění začínají postupným rozšiřováním subgingiválního plaku, čímž dochází k plynulému odtlačování spojovacího epitelu za vzniku parodontální kapsy (chobotu). V parodontálních kapsách dochází ke vzniku zánětu vlivem zbytků potravy a odpadních látek, které se usazují na jejich dně a mohou posléze zahnívat. To bývá doprovázeno nepříjemným zápachem z úst (Rosenbaum, 2015, s. 1). Pod výstelkou těchto parodontálních kapes rovněž probíhá zánět, což vede k nevratnému narušení parodontu a kostní tkáně zubního lůžka (Votava, 2007, s. 486–487). K zánětu jako takovému dochází po vzájemné interakci zubního plaku a imunitního systému člověka (Kinane et al., 2017, s. 1). Je pozoruhodné, že parodontitida postihuje přímo vybrané zuby, nikterak však celý chrup. Mnohdy dochází k situacím, kdy je postižen pouze jeden zub, ale sousední, se kterým sdílí společný mezizubní prostor, postižen není (Slots et al., 2017, s. 7). Parodontitida je závažným problémem, který může vést ve většině případů ke ztrátě zubů, negativnímu ovlivnění žvýkací funkce i ke zhoršení estetické stránky vzhledu (Papapanou et al., 2018, s. 1). Může mít ale i dalekosáhlé důsledky, a to v podobě potratů či předčasných porodů novorozenců s nízkou porodní váhou, cévní mozkové příhody, invalidity i revmatické artritidy (Straka, 2014, s. 1).

1.6 Vliv kouření na stav dutiny ústní

Dutina ústní je jednou z prvních oblastí vystavených cigaretovému kouři, který na ni má negativní účinky. Mezi projevy těchto účinků se řadí okyselení slin (Santacroce et al., 2023, s. 1289), zhoršení slizniční imunity, změna ústního mikrobiomu a aktivní podpora vzniku karcinogeneze (Al Bataineh et al., 2020, s. 2). Kouření rovněž zvyšuje riziko onemocnění dutiny ústní, z těchto onemocnění lze jmenovat např. gingivitidu, parodontitidu, ale i méně závažný zubní kaz. Projevy těchto patologických stavů lze spatřovat zejména v oblasti zubních krčků. Kouřením dochází ke změnám podstaty imunitní reakce sliny a tkáně dutiny, to má za následek snížení schopnosti fagocytózy. Důsledkem toho dochází k vyšší predispozici k mykotickým a virovým infekcím. Mezi další negativní dopady kouření se řadí snížená vaskularizace sliznice a její následné vysušování způsobené vyšší teplotou v dutině ústní (Zoulová, 2012, s. 49). Kouření dále napomáhá kolonizaci dutiny ústní patogenními bakteriemi, které postupně vytlačují komenzály a podporuje tvorbu biofilmu, což vede k větší adhezenci některých patogenů. Jedná se např. o bakteriální druhy *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* (Al Bataineh et al., 2020, s. 2), ale i o rody *Bacillus* a *Clostridium* (Santacroce et al., 2023, s. 1289). V průběhu kouření dochází ke snížení tlaku a obsahu kyslíku v dutině ústní a horní části trávicího traktu, důsledkem toho je aktivně podporována perzistence mikroaerofilních bakterií. Některé studie uvádějí převahu bakteriálních rodů *Atopobium*, *Campylobacter* a *Prevotella* nad běžnými bakteriemi ústní mikroflóry jako jsou rody *Neisseria*, *Rothia*, *Streptococcus*, *Actinomyces* a *Bacteroides*. Změna ústního mikrobiomu vede k celkové dysbióze organismu, což má velký vliv na lokální i systémové zdraví každého jedince (Al Bataineh et al., 2020, s. 2).

Již od poloviny 20. století je známo, že kouření i bezdýmny tabák mají spojitost s onemocněními dutiny ústní, kardiovaskulárními onemocněními i dalšími závažnými onemocněními jako je ku příkladu rakovina. Studie od Robertson et al. z roku 1990 a Greer a Poulson z roku 1983, uvádějí, že pravidelní uživatelé bezdýmného tabáku disponují vysokou procentuální četností slizničních lézí a posunem gingiválního okraje směrem k junkci (gingivální recese). Oba tyto stavy lze nalézt v místě kumulace tabáku. Kouřením dochází k narušení fyziologické orální mikroflóry vlivem oxidačního stresu, to má za následek ztrátu funkce buněk i životaschopnosti některých mikroorganismů. V důsledku fylogeneze si člověk a mikroorganismy vytvořili vzájemný symbiotický vztah, jenž má klíčové postavení při rozvoji různých patologických stavů. Ústní mikroflóra je velmi ovlivněna tím, co člověk konzumuje

a zda užívá např. antibiotika či alkohol. Vědecká skupina Van Winkelhoff et al. ve svém článku, z roku 2001, analyzovala mikrobiální profil v subgingivální oblasti a došla k závěru, že kuřáci bez známek parodontálního onemocnění mají mnohem vyšší výskyt bakterie *Prevotella intermedia/nigrescens* než nekuřáci s parodontitidou. Zároveň uvedli, že kuřáci, kteří se léčili s parodontitidou, mají ve svém ústním mikrobiomu vyšší zastoupení bakterií *Bacteroides forsythus*, *Peptostreptococcus micros* a *Campylobacter rectus* ve srovnání s nekuřáky (Sun et al., 2016, s. 133). Je známo, že aktivní kuřáci mají vyšší prevalenci parodontálních onemocnění než nekuřáci a kouření je zároveň významným ukazatelem rizika ztráty zubů, ztráty úponu a vzniku zubního kazu. Poruchy imunitního systému hostitele mohou být jedním z faktorů, které přispívají k vyššímu výskytu a závažnosti parodontitidy u aktivních uživatelů tabákových výrobků. Studie prokázaly, že látky obsažené v cigaretovém kouři snižují funkce polymorfonukleárních leukocytů jako jsou chemotaxe, fagocytóza či oxidační vzplanutí. Nicméně v rámci dalších studií byla zaznamenána naopak nadměrná aktivace neutrofilů ve slinách. Z několika pozorování je patrné, že lidé, kteří aktivně kouří, mohou mít paradoxně nižší úroveň zánětu dásní, a to z důvodu slabšího prokrvení gingivy v porovnání s nekuřáky. Nicméně toto menší prokrvení může vést ke snížené obranyschopnosti hostitele (Van Winkelhoff et al., 2001, s. 666-667). Krvácení dásní je, jak bylo již řečeno, nižší než v případě nekuřáků, a to vlivem vazokonstrikce cév. Tato vazokonstrikce je způsobena nikotinem, který tak účinně skrývá počáteční příznaky gingivitidy. U parodontitidy dochází k rozvoji tohoto onemocnění u kuřáků až dvakrát rychleji než u nekuřáků. Kromě toho je dalším aspektem, který zhoršuje hojení gingivitidy či parodontitidy, trvalá subgingivální infekce vyvolaná bakteriemi *Bacteroides forsythus* a *Porphyromonas gingivalis*. V průběhu kouření rovněž dochází ke změnám pH, změnám chuti a častým příznakem je i foetox ex ore. Složení plaku u gingivitidy mezi kuřáky a nekuřáky se příliš zásadně neliší, nicméně aktivní kouření podporuje rozvoj specifické skupiny patogenů parodontu (Zoulová, 2012, s. 50–51).

Článek z roku 2019 od skupiny Wu et al. uvádí, že nikotin, který je hlavní složkou tabákových výrobků, má velký vliv na složení orální flóry tím, že potlačuje růst komenzálních mikroorganismů, a naopak napomáhá růstu kariogenních bakterií. V dutině ústní bakterie produkují vlivem metabolisme fermentovaných sacharidů kyselinu, jež má za následek demineralizaci zubní tkáně. *Streptococcus mutans* bývá označován jako klíčový účastník, resp. původce zubního kazu. Nikotin aktivně napomáhá tvorbě biofilmu a metabolismu bakterií *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* či rodu *Lactobacillus* (Wu et al., 2019, s. 2–5).

1.7 Kapnofilní bakterie

Kapnofilní bakterie, jejichž název pochází z řeckého „*kapnos*“, neboli kouř, vyžadují pro svůj růst speciální podmínky. Konkrétně se jedná o vyšší obsah oxidu uhličitého (CO₂) v atmosféře obsahující 5–10 % CO₂. Karbonanhydrázy katalyzují vzájemnou přeměnu CO₂ a HCO₃⁻, čímž dochází k tvorbě dostatečného množství HCO₃⁻ z CO₂ běžné atmosféry. Bakterie, kterým tento enzym chybí, jsou závislé na vysokých koncentracích CO₂ a není je tedy možné kultivovat za standardních atmosférických podmínek (Karahana et al., 2023, s. 1). Kapnofilní bakterie jsou schopné využívat CO₂ i pro metabolické procesy jako je tvorba acetyl-CoA, syntéza aminokyselin či fermentace (Santillan et al., 2015, s. 2). V roce 1952 Tuttle a Scherp prokázali, že *Neisseria meningitidis* rostla účinně při podmínkách zahrnujících 4 % CO₂. V návaznosti na tuto skutečnost byla prokázána závislost mnoha patogenů na atmosféře s vysokým obsahem CO₂, proto také dostali název kapnofilní bakterie. Studie vědecké skupiny Diaz et al. z roku 2002 ku příkladu prokázala, že růst bakterie *Porphyromonas gingivalis* přímo závisí na CO₂ vytvářeném *Fusobacterium nucleatum*, jenž spolu navzájem koexistují, ačkoliv *Porphyromonas gingivalis* se řadí mezi anaeroby. Postupem času docházeli vědci k názoru, že některé mikroorganismy, které jsou závislé na vysokých hladinách CO₂ nemusely být dosud izolovány a rozpoznány (Ueda et al., 2008, s. 4535). Mezi kapnofilní bakterie můžeme řadit příslušníky rodu *Capnocytophaga* (Bilgrami et al., 1992, s. 1045), dále *Haemophilus aphrophilus* (Ho et al., 1984, s. 159), *Campylobacter lari* (Morishita et al., 2012, s. 1), *Eikenella corrodens* (Goldstein et al., 1979, s. 1), kapnofilní *Escherichia coli* (Sahuquillo-Arce et al., 2017, s. 319), *Streptococcus pneumoniae* či *Haemophilus influenzae* (Bolmstrom a Karlsson, 2002, s. 65).

1.8 Rod *Capnocytophaga*

Název *Capnocytophaga* pochází z řeckého „*kapnos*“ (kouř), „*cytos*“ (buňka), „*phagein*“ (jíst). Rod *Capnocytophaga* byl poprvé popsán v roce 1979 vědeckou skupinou Leadbetter et al. Na základě pozorování vlastností a schopnosti napadat polysacharidy byl tento rod zařazen do skupiny cytofágů. Z hlediska jejich růstu, který je závislý na CO₂ (kapnofilní), byla tato skupina organismů pojmenována jako *Capnocytophaga* (Leadbetter et al., 1979, s. 1).

Rod *Capnocytophaga* zahrnuje tenké, vláknité, pomalu rostoucí, fakultativně anaerobní fusiformní gramnegativní tyčinky se zúženými konci. Růst těchto bakterií probíhá nejčastěji na plotnách krevního agaru (KA) a trvá zpravidla 48 h, v některých případech ovšem může kultivace trvat 24–72 h (Pushpa et al., 2016, s. 93). *Capnocytophaga* spp. jsou běžnou součástí

zvířecí i lidské mikroflóry dutiny ústní (Renzi et al. 2018, s. 11). V případě imunokompromitovaných pacientů mohou naopak způsobovat bakteriémie a systémové infekce (Jolivet-Gougeon a Vellend, © 2010–2017, s. 1). Infekce rodem *Capnocytophaga* je nicméně v případě lidí poměrně vzácná, resp. zástupci tohoto rodu většinou nepůsobí jako hlavní vyvolavatelé infekce (Chesdachai et al., 2021, s. 1). Jednotlivé druhy *Capnocytophaga* spp. kolonizující lidský orofarynx jsou spojovány s parodontitidou, septikémií u pacientů se slezinnými či jaterními dysfunkcemi (Murray a Cassese, 2016, s. 35), infekcemi kostí, keratitidami, peritonitidami, hnisavými lymfadenitidami, abscesy nebo např. endokarditidou (Jolivet-Gougeon a Vellend, © 2010–2017, s. 1). Dle studií je nejčastěji se vyskytujícím mikroorganismem, který způsobuje onemocnění a případně zdravotní obtíže či systémové infekce *Capnocytophaga canimorsus* (Chesdachai et al., 2021, s. 3).

Bakteriémie se mohou vyskytovat ve spojitosti se zoonotickými i humánně-orálními druhy *Capnocytophaga*. Ve spojitosti s infekcemi *Capnocytophaga canimorsus* byly již dříve popsány klinické projevy jako horečka neznámého původu, meningitida, endokarditida, mozkový absces, infekce dýchacích cest, mykotické aneurysma či ortopedické infekce. Na rozdíl od *Capnocytophaga canimorsus* jsou klinické projevy infekce *Capnocytophaga* spp. u člověka jiné a hůře prozkoumané. Některé studie však poukazují na souvislost orálních druhů *Capnocytophaga* se vznikem některých onemocnění – pleurální empyém, chorioamnionitida či novorozenecká seps (Chesdachai et al., 2021, s. 1).

1.8.1 Taxonomie

Bakterie rodu *Capnocytophaga* patří do kmene *Bacteroidetes* a čeledi *Flavobacteriaceae*, v současné době je evidováno 15 druhů rodu *Capnocytophaga*, ale pouze 12 jich je uznáno a validováno. Taxonomické rozdělení pochází z databází LPSN a ITIS, viz tabulka č. 3 níže.

Tabulka 3 Taxonomie rodu *Capnocytophaga*

Taxonomie	
Říše	<i>Bacteria</i>
Podříše	<i>Negibacteria</i>
Kmen	<i>Bacteroidetes</i>
Třída	<i>Flavobacteriia</i>
Řád	<i>Flavobacteriales</i>
Čeď	<i>Flavobacteriaceae</i>
Rod	<i>Capnocytophaga</i>
Druh	<i>Capnocytophaga canimorsus</i> <i>Capnocytophaga catalasegens</i> <i>Capnocytophaga cynodegmi</i> <i>Capnocytophaga canis</i> <i>Capnocytophaga felis</i> <i>Capnocytophaga gingivalis</i> <i>Capnocytophaga granulosa</i> <i>Capnocytophaga haemolytica</i> <i>Capnocytophaga leadbetteri</i> <i>Capnocytophaga ochracea</i> <i>Capnocytophaga periodontitidis</i> <i>Capnocytophaga sputigena</i>

Zdroj: Data z databáze LPSN a ITIS, 2012 a 2018

Klinické izoláty *Capnocytophaga* spp. jsou klasifikovány do 2 větších skupin, a to na druhy nalezené v dutině ústní člověka a druhy kolonizující dutinu ústní psů a koček, vzácněji i králíků. Mezi druhy nalezené v dutině ústní člověka se řadí: *C. gingivalis*, *C. granulosa*,

C. haemolytica, *C. leadbetteri*, *C. ochracea* a *C. sputigena*. Do dutiny ústní psů a koček spadají *C. canimorsus* a *C. cynodegmi* (Jolivet-Gaugeon a Vellend, © 2010–2017, s. 1).

1.8.2 Faktory virulence orálních druhů *Capnocytophaga*

Nerovnoměrné rozložení faktorů virulence mezi izoláty naznačuje, že patogenní potenciál může být spojován výhradně s některými druhy. Kupříkladu *Capnocytophaga gingivalis* má silnější proteolytickou aktivitu než *C. sputigena* a *C. ochracea*. Dále lipopolysacharidy druhu *C. gingivalis* mají hemaglutinační aktivitu na rozdíl od *C. ochracea*. Dřívější studie od Shurin et al. z roku 1979 a Van Dyke et al. z roku 1982 poukazyvaly na jakousi imunosupresivní schopnost rodu *Capnocytophaga*, a to konkrétně na polymorfonukleární neutrofilů, včetně potlačení jejich chemotaxe. Další studie Ochiai et al. z roku 1998 potvrdila skutečnost, že sonické extrakty z rodu *Capnocytophaga* inhibují proliferaci lymfocytů v reakci na působení mitogenů (Frandsen et al., 2008, s. 325). Ústní *Capnocytophaga* produkují řadu buněčně vázaných či extracelulárních faktorů, které mohou podporovat progresi parodontitidy tím, že umožňují růst bakterií v zubním plaku a subgingiválních parodontálních kapsách nebo tím, že se brání imunitním reakcím hostitele. Mezi tyto faktory virulence se např. řadí IgA1 proteáza, fosfolipáza A2, aminopeptidázy a chemotaxi řízená motilita (Janda, 2015, s. 1).

1.8.3 Biochemické testy a citlivost na antibakteriální látky

Biochemické testy je obtížné provádět kvůli pomalému růstu mikroorganismu. *Capnocytophaga canimorsus* je pozitivní na katalázu a oxidázu, ONPG a arginin dihydrolázu, negativní na ureázu, nitráty, indol, DNázu, želatinu, lysin a ornitin. Příslušníci rodu *Capnocytophaga* mohou jako fermentovatelné substráty a zdroj energie využívat různé sacharidy jako např. glukózu, dextran, glykogen, inulin či škrob (Gaastra et al., 2010, s. 4–5). Na rozdíl od *C. canimorsus* jsou *C. ochracea*, *C. sputigena*, *C. gingivalis* na přítomnost katalázy a oxidázy negativní (Forlenza, 1991, s. 2).

Tabulka 4 Biochemické charakteristiky

Charakteristika	<i>C. ochracea</i>	<i>C. sputigena</i>	<i>C. gingivalis</i>
Oxidáza	-	-	-
Kataláza	-	-	-
Amygdalin	+	ND	ND
Celobióza	+	ND	ND
Fruktóza	+	+	ND
Galaktóza	+	ND	ND
Glukóza	+	+	ND
Laktóza	+	ND	ND
Rafinóza	+	ND	ND
Alkalická fosfatáza	+	+	+
Kyselá fosfatáza	+	+	+
Trypsin	-	-	+
α -Galaktosidáza	-	-	-
β -galaktosidáza	+	+	-
β -Glukuronidáza	-	-	-
α -Glukosidáza	+	+	+
β -glukosidáza	-	-	+
α -fukosidáza	-	-	-
α -mannosidáza	-	-	-

Zdroj: vlastní zpracování dle (Antezack et al., 2021, upraveno)

Poznámka: „+“ – pozitivní výsledek, „-“ – negativní výsledek „ND“ – údaje nejsou k dispozici

Bakterie rodu *Capnocytophaga* jsou citlivé na makrolidy, klindamycin, tetracyklin, linezolid, chloramfenikol, imipenem a chinolony (Government of Canada, 2011, s. 1). Dále jsou citlivé vůči amoxicilinu, cefriaxonu, cefepimu, doxycyklinu, fluorochinolonu, kolistinu a k betalaktamům širšího spektra (Janda, 2015, s. 1). Naopak rezistentní jsou např. k aminopenicilinům, cefalosporinům 1. generace, cefuroximu a některým perorálním cefalosporinům 3. generace (Jolivet-Gaugeon a Vellend, © 2010–2017, s. 1).

1.8.4 *Capnocytophaga gingivalis*

Capnocytophaga spp. jsou celosvětově distribuovány coby součást normální mikroflóry dutiny ústní napříč všemi věkovými skupinami. Nicméně za určitých podmínek mohou způsobit i závažná parodontální onemocnění (Lawal a Baer, 2021, s. 1).

Leadbetter et al. pojmenovali v roce 1982 nový bakteriální druh rodu *Capnocytophaga*, a to *Capnocytophaga gingivalis*, z lat. *gingiva*, tj. dásně (LPSN databáze, 2012). *C. gingivalis* je pomalu rostoucí, kapnofilní a fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinka, která nedosahuje takové invazivity jako ostatní druhy, nicméně infekce touto bakterií není vyloučena (Lawal a Baer, 2021, s. 1). Na rozdíl od ostatních druhů má velmi silnou proteolytickou aktivitu, kterou snadno využije ve svůj prospěch (Frandsen et al., 2008, s. 325). Z hlediska biochemického testování *C. gingivalis* nehydrolyzuje škrob, dextran, galaktózu, trehalózu, salicin, chitin, ribózu, eskulin a sorbitol. Negativně opět vychází i testy na přítomnost enzymů katalázy i oxidázy (London et al., 1985, s. 370).

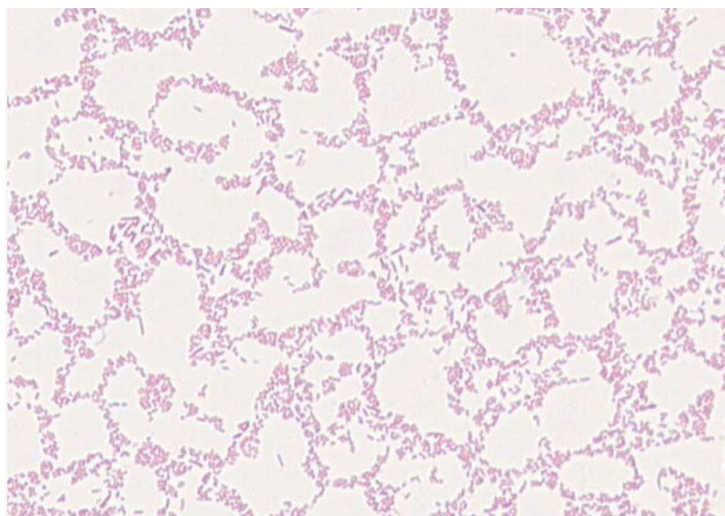


Obrázek 2 *C. gingivalis* na KA po 48 h kultivace, převzato z *Microbe Canvas*, 2020, upraveno

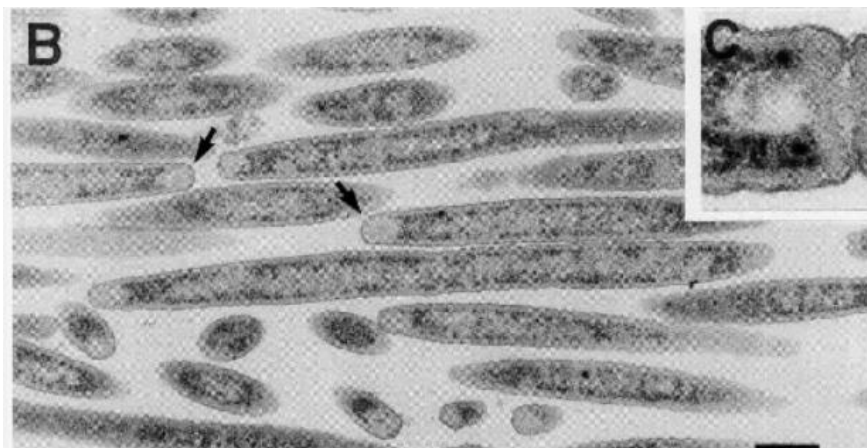
1.8.5 *Capnocytophaga granulosa*

Bakterie *Capnocytophaga granulosa* byla navržena vědeckou skupinou Yamamoto et al. roku 1994 jako název pro nový bakteriální druh spadající do rodu *Capnocytophaga*. *C. granulosa* byla poprvé vyizolována ze supragingiválního plaku pacienta s chronickou parodontitidou. Název byl zvolen na základě výskytu jasných intracelulárních granulárních inkluzí, které bylo možno pozorovat uprostřed a na krajích obarvených buněk dle Grama. Tyto charakteristické inkluze lze spatřovat při anaerobní kultivaci při 37 °C na GAM médiu 5–7 dní, snadno pozorovatelné jsou při obarvení bazickým fuchsinem (Yamamoto et al., 1994, s. 324). GAM (Gifu Anaerobic Medium) je tekuté médium určené pro anaerobní bakterie, a to díky svému složení, v němž je majoritně zastoupeno natrávené sérum obsahující hemin. Hemin se využívá k úspěšné kultivaci anaerobních mikroorganismů jako jsou streptokoky, meningokoky a pneumokoky. Toto médium je rovněž vhodné i pro kultivaci hemokultur (HiMedia Laboratories Private Limited, © 2023).

Capnocytophaga granulosa jsou tenké gramnegativní tyčinky. Kolonie, které tato bakterie vytváří jsou ploché a tenké s nerovnými okraji, po 5–7 dnech kultivace na TBBP agaru dosahují průměru 1–2 mm. Vzhled kolonií na KA (krevní agar) i TBBP agaru je spíše šedé až fialové barvy bez hemolýzy, zatímco na půdě obsahující větší zastoupení sóji, je zbarvení žluté až oranžové. Kultury rostou i za mikroaerofilních podmínek či na KA inkubovaném při 37 °C v 5 % CO₂. Bakterie *C. granulosa* je citlivá na aktinomycin, dále vykazuje negativitu na oxidázu, katalázu, redukci dusičnanů, produkci H₂S a produkci indolu (Yamamoto et al., 1994, s. 325).



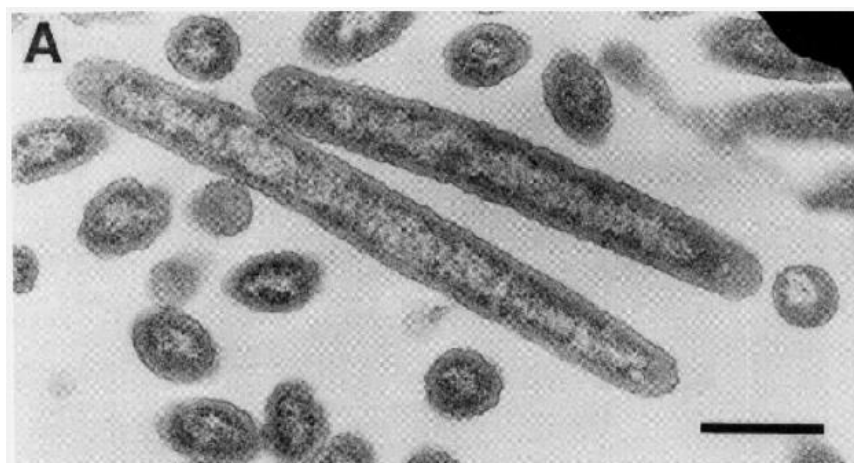
Obrázek 3 *C. granulosa* dle Gramova barvení, převzato z GMBANK, celkové zvětšení 1000x, upraveno



Obrázek 4 Snímek granulí *C. granulosa* z elektronového mikroskopu, převzato od Yamamoto et al., 1994, upraveno

1.8.6 *Capnocytophaga haemolytica*

Bakterie *Capnocytophaga haemolytica* stejně jako *Capnocytophaga granulosa* byly objeveny vědeckou skupinou Yamamoto et al. v roce 1994. Název je odvozen z latinského „*haima*“ (krev) a „*lyticus*“ (rozpustit, uvolnit), tj. schopné rozpouštět krev, resp. vytvářet hemolýzu (Parte et al., 2011, s. 1). Tato bakterie jako jediná z rodu *Capnocytophaga* vykazuje na TBBP agaru jasné známky hemolýzy, konkrétně se jedná o β -hemolýzu. *C. haemolytica* je gramnegativní bakterie, která má tvar tenkých tyčinek. Kolonie jsou ploché tenké s průměrem 1–2 mm, nárůst je patrný po 5–7 dnech anaerobní kultivace při 37 °C na TBBP agaru. Zbarvení kolonií je u této bakterie dosti podobné jako u *C. granulosa*, tj. šedé až fialové na TBBP a KA a žluté či oranžové na sójovém agaru Trypticase. Kultury rostou za mikroaerofilních podmínek a mohou snadno růst na KA při 37 °C inkubaci za přítomnosti 5 % CO₂ (Yamamoto et al., 1994, s. 324).



Obrázek 5 Snímek *C. haemolytica* z elektronového mikroskopu, převzato od Yamamoto et al., 1994, upraveno

1.8.7 *Capnocytophaga ochracea*

Capnocytophaga ochracea je gramnegativní tyčinkovitá bakterie, která při kultivaci na pevném médiu vykazuje klouzavý pohyb. Poprvé byla izolována z lidských lézí parodontitidy, avšak pozdější studie ukázaly, že se přirozeně vyskytuje i v zubním plaku osob se zdravým parodontem. *Capnocytophaga ochracea* má schopnost vytvářet společně s *Fusobacterium nucleatum* biofilm, který podporuje růst *C. ochracea*, tvoří hlavní strategii kolonizace povrchů tímto bakteriálním druhem. *Fusobacterium nucleatum* představuje jakýsi most mezi původními bakteriemi na povrchu zubu a pozdějšími patogenními bakteriemi (Kita et al., 2016, s. 1756).

Jednotlivé druhy rodu *Capnocytophaga* není na první pohled jednoduché rozlišit, proto je nutné provést minimálně biochemickou analýzu, 16S rRNA sekvenování a v neposlední řadě MALDI-TOF analýzu (Ito et al., 2016, s. 2732). Ve studii z roku 2016 Ito et al. prokázali bakteriální druh *C. ochracea* v krevní kultuře pacienta, který byl dlouhodobě hospitalizovaný po srdečním selhání. Testy izolátů druhu *C. ochracea* prokázaly jasnou negativitu na katalázu a oxidázu. Biochemické testování těchto izolátů bylo provedeno pomocí API 50 CH a výsledek ukázal, že produkce kyselin z xylózy, trehalózy, ribózy, manitolu, arabinózy, melibózy a sorbitolu vyšla pro *C. ochracea* negativní. Dále tyto testy odhalily, že *C. ochracea* hydrolyzuje škrob a glykogen, fermentuje glukózu, maltózu, fruktózu, laktózu, selektivně galaktózu, amygdalin, manózu a inulin (Ito et al., 2016, s. 2732).

C. ochracea je pro imunokompromitované jedince význačným patogenem, neboť může způsobit závažná onemocnění. V případě takto oslabených jedinců se úmrtnost vlivem této oportunitní bakterie uvádí v rozmezí 14–43 %. V případě narušení ústní slizniční bariéry způsobené parodontitidou či mukozitidou, dojde k průniku této bakterie do krevního řečiště, což může vést k sepsi, gangréně, endokarditidě či purpuře fulminans (Desai et al., 2007, s. 107).

1.8.8 *Capnocytophaga sputigena*

Leadbetter et al. v roce 1982 pojmenovali další druh rodu *Capnocytophaga* vyskytující se v dutině ústní člověka, a to *Capnocytophaga sputigena*. Název pochází z lat. „sputum“ neboli plivat (LPSN databáze, 2012). *Capnocytophaga sputigena* je pomalu rostoucí, kapnofilní a fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinka, která se běžně vyskytuje v orofaryngeální mikroflóře člověka. *C. sputigena* je typickým komenzálním mikroorganismem s tendencemi způsobovat infekce u imunokompromitovaných jedinců. Způsobuje parodontální onemocnění a orofaryngeální abscesy se sklonem k expanzi do přilehlých dutin za vzniku sinusitid, ale může

se podílet i na vzniku keratitid, edoftalmitid a osteomyelitid. Kromě těchto lokálních infekcí může způsobit i systémové komplikace jako jsou bakteriémie, peritonitidy, ale i např. endokarditidy. Podle dříve dostupných informací nevytvářela *C. sputigena* na rozdíl od *C. ochracea* biofilm, v současnosti ale Fabre et al. v roce 2021 tuto schopnost potvrdili na případu, kdy *C. sputigena* vytvořila biofilm na centrálním žilním katetru (Fabre et al., 2021, s. 1).

Z hlediska biochemických vlastností *C. sputigena* proměnlivě fermentuje fruktózu a dextran a hydrolyzuje eskulin. Stejně jako oba předchozí druhy vykazuje jasnou negativitu na katalázu a oxidázu (Parte et al., 2011, s. 1).



Obrázek 6 *Capnocytophaga sputigena* na KA po 48 h kultivace, převzato z *Microbe Canvas*, 2020, upraveno

1.9 Deoxyribonukleotidová kyselina

Deoxyribonukleová kyselina neboli DNA, je nositelkou genetické informace a skládá se ze dvou dlouhých polynukleotidových řetězců, které navzájem pojí vodíková vazba. Díky této vazbě drží oba řetězce při sobě (Alberts et al., 2002, s. 1). Základní kostrou této nukleové kyseliny je struktura zvaná nukleotid. Nukleotid je složen z pentózového cukru, dusíkaté báze a fosfátové skupiny (Ghannam et al., 2023, s. 1). V případě DNA se jedná o cukr zvaný 2'- deoxyribóza, báze tvořící DNA jsou puriny adenin (A) a guanin (G) a pyrimidiny cytosin (C) a thymin (T). Tyto báze se mezi sebou na základě komplementarity pojí, již výše zmiňovanými, vodíkovými vazbami. Počet vodíkových vazeb závisí na chemické povaze a struktuře bází. Vždy se vzájemně párují A-T a C-G, mezi A-T vzniká dvojitá vodíková vazba a mezi C-G vazba trojitá. Výsledkem tohoto specifického párování je poměr pyrimidinů a purinů v kterékoliv buňce přibližně 1:1, tato skutečnost je známá pod pojmem Chargaffovo pravidlo (Ghannam et al., 2023, s. 1). Komplementárním párováním bází lze dosáhnout energeticky nejvýhodnějšího uspořádání uvnitř dvojité šroubovice. Při takovémto uspořádání má každý pár bází odpovídající si šířku, což umožňuje udržovat komplex cukr-fosfát ve shodné vzdálenosti od sebe podél celé molekuly DNA. Struktura DNA vypadá tak, že cukry jsou situovány na vnější straně, zatímco báze směřují dovnitř, dohromady vytváří celek zvaný cukr-fosfátová páteř. Aby bylo dosaženo co možná nejvýhodnějšího energetického stavu, dochází ke vzniku dvoušroubovice s jedním plným otočením každých deset párů bází. Oba řetězce dvoušroubovice jsou k sobě navzájem komplementární za pomoci nukleotidové sekvence. Řetězce musejí do sebe navzájem zapadat, to se stane pouze ve chvíli, kdy jsou k sobě tzv. antiparalelní neboli opačně orientované (Alberts et al., 2002, s. 1). Tato skutečnost se projevuje takovým způsobem, kdy 5' konec jednoho vlákna je 3' konec druhého. Takovéto vzájemné párování vytváří tzv. sekundární strukturu DNA (Ghannam et al., 2023, s. 1).

Terciární strukturu DNA vytváří výše zmíněná pravotočivá dvoušroubovice. Báze jsou pravidelně rozmístěné ve vzdálenostech 0,34 nm podél celé šroubovice, její úplný obrat probíhá každých 3,4 nm. DNA má rotaci 36° na pár bází (bp) a šroubovicový průměr činí 1,9 nm. V páteři šroubovice existují dva spirálové žlábků s různou šířkou známé též jako malý a velký žlábek. Malý žlábek vymezuje prostor mezi dvěma antiparalelními vlákny DNA, které probíhají nejbližší k sobě, kdežto velký žlábek zaujímá místo, kdy jsou od sebe vlákna nejdále. Tyto dva morfologické prvky utváří B-DNA formu, jež je hlavní formou DNA přítomnou v buňce. Kromě B formy DNA se vyskytují vzácněji ještě A a Z formy. A-DNA je rovněž pravotočivá

dvoušroubovice, ale vzdálenost mezi bázemi je o něco menší, a to 0,256 nm, což má za následek více bází na otočku, celkem 11. Z forma je naopak levotočivá dvoušroubovice, která je přítomná v místech, kde se střídá mnoho purinů a pyrimidinů. Nejčastější formou DNA je tedy forma B, neboť je nejstabilnější terciární strukturou z hlediska energie (Ghannam et al., 2023, s. 1).

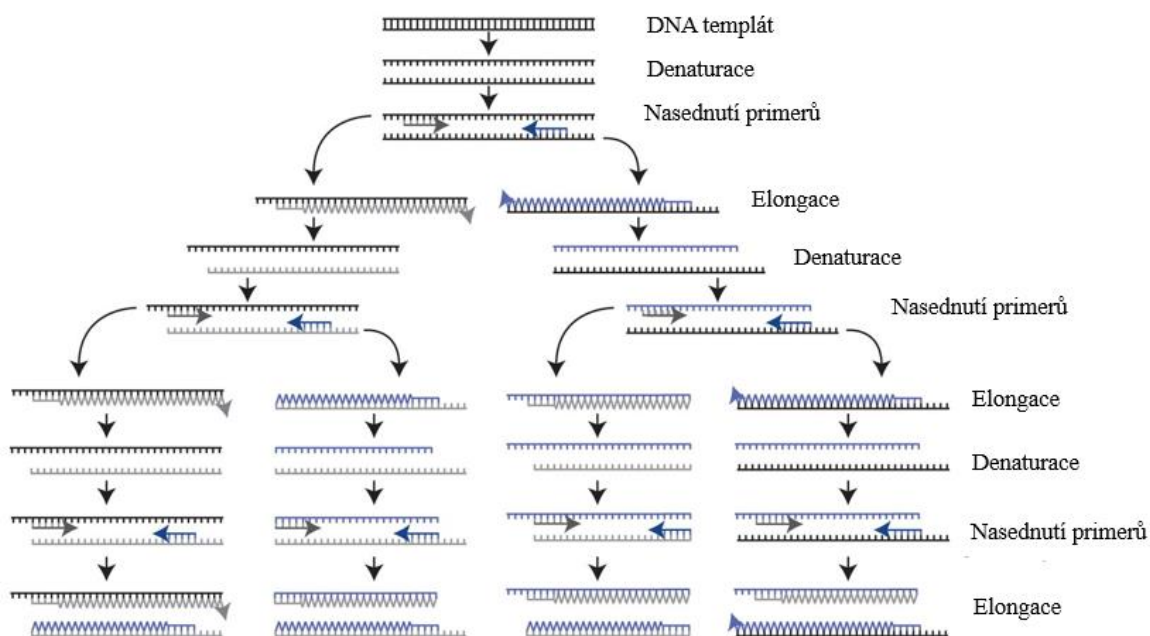
1.10 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce neboli PCR je výkonná amplifikační technika, která vytváří dostatečné množství specifického segmentu DNA, tzv. amplikonu. K tomuto úkonu je zapotřebí pouze malé množství výchozího materiálu, templátu DNA či cílové sekvence. Přestože se nejedná o příliš složitou metodu, mnohdy dochází ke komplikacím, které následně vedou k falešným výsledkům. Mezi tyto výsledky můžeme započítat vznik nespecifických produktů o různých velikostech či nevytvoření žádných produktů (Lorenz, 2012, s. 1). Templátová DNA je známá cílová sekvence, kterou je nutné amplifikovat, velikostně se pohybuje v rozmezí 100–1000 párů bází (bp). Primery jsou krátké oligonukleotidy, tj. jednořetězcové sekvence nukleové kyseliny, které specificky nasedají na konkrétní místa nukleové kyseliny. Při PCR se používají páry primerů – dopředný (forward) a reverzní (reverse), každý z nich má délku přibližně 16–20 párů bází. Hlavní enzym, který replikuje DNA a pojí jednotlivé nukleotidy dohromady za vzniku PCR produktu se nazývá DNA polymeráza, tímto způsobem dochází ke zmnožení cílových sekvencí DNA (Maheaswari, 2016, s. 4).

1.10.1 Postup metody PCR

Nejprve dochází k extrakci DNA ze vzorku prostřednictvím tepla, chemicky či enzymaticky. Po extrakci se cílová nukleová kyselina přidá do reakční směsi, která obsahuje primery, DNA polymerázu a aditiva. Tyto aditiva se využívají pro optimalizaci aktivity polymerázy, jedná se zejména o pufr, kation $MgCl_2$, soli, enzymy a deoxynukleotidy. Následně se tato reakční směs s přidanou cílovou nukleovou kyselinou vloží do termocykleru ve speciální zkumavce určené pro PCR. Proces PCR zahrnuje 3 kroky, které se v rámci obecného schématu opakují 30krát. Tyto kroky jsou: denaturace, annealing a elongace DNA (Maheaswari, 2016, s. 4). Při denaturaci dochází k separaci obou řetězců DNA na dva jednoduché, probíhá při teplotě 92–95 °C (Gupta, 2019, s. 3). Annealing, neboli nasednutí primerů, nastává při teplotách 50–58 °C, pár primerů (dopředný a reverzní) se smíchá s denaturovanou cílovou DNA, dopředný primer nasedá na specifické místo jednoho konce vlákna a reverzní se navazuje na specifické místo opačného konce komplementárního vlákna. Elongace spočívá v působení

enzymu DNA polymeráza, kdy za pomoci prodlužování primerů vznikají nová komplementární vlákna, tento proces probíhá při teplotě 72 °C (Maheaswari, 2016, s. 4). Po ukončení PCR dochází většinou k identifikaci produktu, ampliconu. Nejčastěji se identifikace provádí prostřednictvím gelové elektroforézy, nejčastěji na agarózovém či polyakrylamidovém gelu, v nichž je pro vhodnou vizualizaci rozpuštěn ethidium bromid (Maheaswari, 2016, s. 5). Ethidium bromid (EtBr) je kationtové barvivo, konkrétně čtyřkruhová aromatická molekula, která silně a velmi specificky reaguje s dvouvláknovou DNA i RNA prostřednictvím interkalačního mechanismu. Jedná se o jakési vmezeření mezi sousední páry bází (Ge et al., 2019, s. 1). Amplicony poté fluoreskují při osvětlení UV zářením a vytváří v gelu jeden pruh na základě velikostí jednotlivých produktů (Maheaswari, 2016, s. 5).



Obrázek 7 Schéma PCR reakce, převzato od Green a Sambrook, 2019, upraveno

1.10.2 Detekce orálních druhů *Capnocytophaga* metodou PCR

Odběr vzorků, kultivace, izolace DNA

V práci od Hayashi et al. z roku 2001 prováděli odběr vzorků zubního plaku ze zubních kartáčků pomocí vymývání v 15 ml sterilní destilované vody. Poté byla tato suspenze transportována ihned do laboratoře a uložena do -20 °C. V laboratoři tuto suspenzi centrifugovali při 1600x g 20 min. Supernatant zlikvidovali a buněčné pelety posléze skladovali při teplotě -20 °C až do izolace DNA. Genomovou DNA ze vzorku plaku získali pomocí

Miniprep soupravy, genomovou DNA navíc upravili pomocí RNázy. Vzorky genomové DNA rozpustily ve 30 µl TE pufru a uložili do -20 °C.

Metoda PCR

Dle protokolu Hayashi et al. (2001) se v rámci PCR pomnožila bakteriální DNA ze vzorků v 50 µl reakční směsi obsahující 100 ng vzorku DNA, 1x PCR pufr, který obsahoval 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl a pH 9,0, dále 0,2 mM deoxyribonukleotidové směsi, 5 pmol každého primeru a 2 jednotky *Taq* DNA polymerázy. Po zařazení pozitivní a negativní kontroly uložili namíchanou směs do termocykleru, kde nastavili program na 36 cyklů. Před začátkem cyklů se reakční komponenty bez enzymu udržovaly při teplotě 95 °C po dobu 5 min, a to z důvodu zlepšení specifčnosti PCR, aby se zabránilo falešné hybridizaci.

Gelová elektroforéza

Po ukončení PCR reakce pokračovali gelovou elektroforézou na 1,2% agarózovém gelu s barvivem ethidium bromid. Nově nasyntetizované fragmenty DNA vizualizovali pomocí UV záření o vlnové délce 302 nm. Výsledek PCR odečetli na základě rozboru produktů markerů ke značce 100 bp (Amersham Pharmacia Biotech, AB).

Výsledky

Hayashi et al. (2001) ve svém článku zkoumali výskyt jednotlivých druhů *C. ochracea*, *C. sputigena* a *C. gingivalis* v zubním plaku dětí ve věku 2–12 let vždy v závislosti na stavu jejich dutiny ústní. Resp. zda dotyčné děti měly zdravé dásně nebo trpěly prokázanou gingivitidou či parodontitidou. V této studii rozdělili děti na 2 věkové kategorie – primární a kombinovanou. Primární kategorie zahrnovala děti ve věku od 2 let a 1 měsíce do 6 let a 6 měsíců a kombinovaná kategorie zahrnovala děti ve věku od 5 let a 4 měsíců do 12 let a 3 měsíců. Ve výsledcích uvedli, že z celkového počtu 122 odebraných vzorků se jako pozitivní na *C. ochracea* prokázalo 107, tj. 87,7 % a na *C. sputigena* 46, tj. 37,7 %. Druh *C. gingivalis* se potvrdil ve 105 případech z celkového počtu 122 vzorků, tj. z hlediska procentuálního zastoupení se jednalo o pozitivitu v 86,1 %. V rámci rozdělení do věkových kategorií a dle stavu dutiny ústní uvedli, že *C. ochracea* se v primární věkové kategorii (2–6 let) vyskytovala ve 100,0 % u dětí se zdravými dásněmi, v 90,0 % u dětí s diagnostikovanou gingivitidou a v 50,0 % s diagnostikovanou parodontitidou. Ve druhé kombinované věkové kategorii, tj. u dětí v rozmezí věku 5–12 let se *C. ochracea* vyskytovala ve 100,0 % u dětí se zdravými dásněmi, v 89,2 % u dětí s diagnostikovanou gingivitidou a v 50,0 % s diagnostikovanou

parodontitidou. Výskyt *C. sputigena* u dětí v primární skupině se potvrdil u 46,2 % osob se zdravými dásněmi, u 45,0 % s diagnostikovanou gingivitidou a v 25,0 % u dětí s diagnostikovanou parodontitidou. Ve starší věkové skupině, kombinované, se *C. sputigena* prokázala v 50,0 % u dětí se zdravými dásněmi, v 33,9 % u dětí s diagnostikovanou gingivitidou a v 25,0 % u dětí s diagnostikovanou parodontitidou. Nejvyššího procentuálního zastoupení v dutině ústní dosahovala *C. gingivalis*, která se nacházela u dětí v primární skupině se zdravými dásněmi v 92,3 %, s diagnostikovanou gingivitidou v 90,0 % a s diagnostikovanou parodontitidou v 50,0 %. Ve věkové kategorii 5–12 let se *C. gingivalis* vyskytovala ve 100,0 % u dětí se zdravými dásněmi, v 83,1 % s diagnostikovanou gingivitidou a v 87,5 % s diagnostikovanou parodontitidou. Výsledky této studie přehledněji shrnuje tabulka č. 15 níže.

Tabulka 5 Shrnutí výsledků studie Hayashi et al. z roku 2001

Věkové rozmezí	<i>C. ochracea</i>		
	Zdravé dásně	Gingivitida	Parodontitida
2 roky 1 měsíc - 6 let 6 měsíců	100,0 %	90,0 %	50,0 %
5 let 4 měsíce - 12 let 3 měsíce	100,0 %	89,2 %	50,0 %
Celkový výskyt	87,7 %		
Věkové rozmezí	<i>C. sputigena</i>		
	Zdravé dásně	Gingivitida	Parodontitida
2 roky 1 měsíc - 6 let 6 měsíců	46,2 %	45,0 %	25,0 %
5 let 4 měsíce - 12 let 3 měsíce	50,0 %	33,9 %	25,0 %
Celkový výskyt	37,7 %		
Věkové rozmezí	<i>C. gingivalis</i>		
	Zdravé dásně	Gingivitida	Parodontitida
2 roky 1 měsíc - 6 let 6 měsíců	92,3 %	90,0 %	50,0 %
5 let 4 měsíce - 12 let 3 měsíce	100,0 %	83,1 %	87,5 %
Celkový výskyt	86,1 %		

Poznámka: vlastní tabulka vytvořená pro větší přehlednost výsledků

1.10.3 Detekce orálních druhů *Capnocytophaga* metodou real-time PCR

Odběr vzorků, kultivace, izolace DNA

V práci Shigeishi et al. z roku 2024 prováděli odběr vzorků dentálních plaků stíráním z povrchu jazyka užitím jednorázových stěrových kartáčků Ocellex® Brush, bezprostředně po stěru ponořili kartáček do lyzačního pufru S1- Lysis Buffer v 15 ml zkumavce. Úplnou izolaci DNA z kartáčku provedli pomocí purifikačního kitu PureLink™ Microbiome DNA Purification kit (Thermo Fisher Scientific).

Metoda PCR

Pro detekci DNA *C. ochracea* a *C. sputigena* vyžili směs THUNDERBIRD SYBR qPCR mix (Toyobo Life Science) a specifické páry primerů. V při tomto pokusu provedli dvě nezávislá testování. Nejprve využili univerzální primer pro 16S rRNA, který využili jako referenční, jeho sekvence byly: dopředný 5'-CGCTAGTAATCGTGG ATCAGAATG-3' a reverzní 5'-TGTGACGGGCGGTGT GTA-3'. Poté provedli PCR i se specifickými primery pro *C. ochracea*: dopředný primer 5'-AGA GTTTGATCCTGGCTCAG-3 a reverzní primer 5'-GATGCCGTC CCTATATACTATGGGG-3'. Pro *C. sputigena* využili: dopředný primer 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' a reverzní primer 5'-GATGCCGCTCCTATATAACCATTAGG-3'. Program PCR reakce provedli následovně: počáteční denaturace 95 °C 2 min, následovalo 40 cyklů při 95 °C po dobu 30 s, nasedání primerů při teplotě 58 °C 30 s, prodlužování při 72 °C 30 s a závěrečné prodlužování při 72 °C 2 min.

Výsledky

Shigeishi et al. (2024) ve své studii zkoumali prevalenci orálních druhů *Capnocytophaga* a jejich asociaci s kumulací zubního plaku a parodontálních zánětů u osob středního až vyššího věku. Metodou, kterou využili pro testování přítomnosti daných druhů bakterií, byla real-time PCR. Touto technologií určili celkový výskyt orálních *C. ochracea* v 67,6 % a *C. sputigena* v 83,1 % případů u 136 pacientů. Studie se účastnilo 43 mužů a 93 žen ve věku 36–91 let. *C. ochracea* vyšla u mužů pozitivní v 39,1 % a u žen v 60,9 %. Výskyt *C. sputigena* prokázali u 31,9 % mužů a 68,1 % žen. Jako významnou uvedli asociaci výskytu *C. ochracea* na pohlaví a zároveň uvedli, že není žádný spojitost výskytu *C. ochracea* s klinickými příznaky, věkem, systémovými onemocněními, počtem zbývajících zubů či používáním zubních náhrad. Dále uvedli, že v případě výskytu *C. sputigena* nebyla zjištěna žádná souvislost s klinickými

příznaky, věkem, pohlavím, systémovým onemocněním, počtem zubů a používáním zubních náhrad. Z hlediska kumulace zubního plaku prokázali vyšší procento kumulace u pacientů s pozitivním průkazem *C. ochracea* (21,0 %), než u pacientů s negativním průkazem (14,0 %). V případě *C. sputigena* vyšel výsledek shodně, tj. vyšší procento kumulace plaku bylo u pacientů s pozitivním průkazem *C. sputigena* (21,0 %) než u pacientů s negativním průkazem (15,0 %). V této studii posléze prokázali, že u pacientů s pozitivním výskytem *C. ochracea* byly parodontální kapsy hlubší než 4 mm a po jejich sondáži byla patrná krvácivost, než u pacientů s negativním průkazem *C. ochracea*. Stejného výsledku dosáhli i v případě *C. sputigena*, nicméně oba tyto poznatky nepovažovali za významné.

1.11 Agarózová gelová elektroforéza

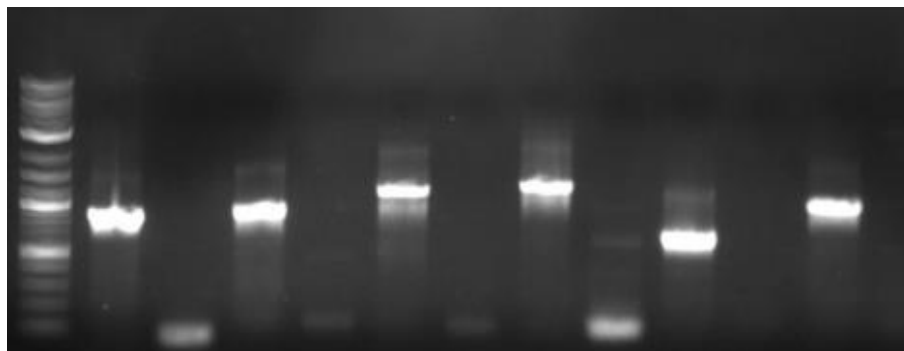
Elektroforéza na agarózovém gelu je nejúčinnějším způsobem separace fragmentů DNA v rozmezí velikostí 100–25 000 bp. Agaróza je polysacharid izolovaný z mořských řas rodů *Gelidium* a *Gracilaria* a skládá se z opakovaných jednotek agarobiózy (L- a D-galaktózy). V procesu tvorby gelu se agarózové polymery nekovalentně spojují a tvoří síť svazků, jejichž velikost pórů určuje vlastnosti gelu, slouží jako tzv. molekulární síto. Dříve, než se začala používat tato technologie, využívala se pro separaci DNA centrifugace v hustotním gradientu sacharózy, avšak tento výsledek byl nepřesný a pouze orientační (Lee et al., 2012, s. 1). Molekula DNA je, jak již bylo zmíněno výše, tvořena dvěma dlouhými polynukleotidovými řetězci, které jsou k sobě navzájem komplementární (Alberts et al., 2002, s. 1). K rozdělení DNA dle velikosti za pomoci elektroforézy na agarózovém gelu se nejprve příslušná DNA nanese do předem odlitých jamek v gelu, poté se připojí elektroforetická vana ke zdroji napětí. Fosfátová skupina molekuly DNA (i RNA) je záporně nabitá, po vložení vzorku obsahujícího danou nukleovou kyselinu do stejnosměrného elektrického pole, dojde k migraci této nukleové kyseliny ke kladně nabitě anodě (Lee et al., 2012, s. 1).

1.11.1 Průběh agarózové gelové elektroforézy

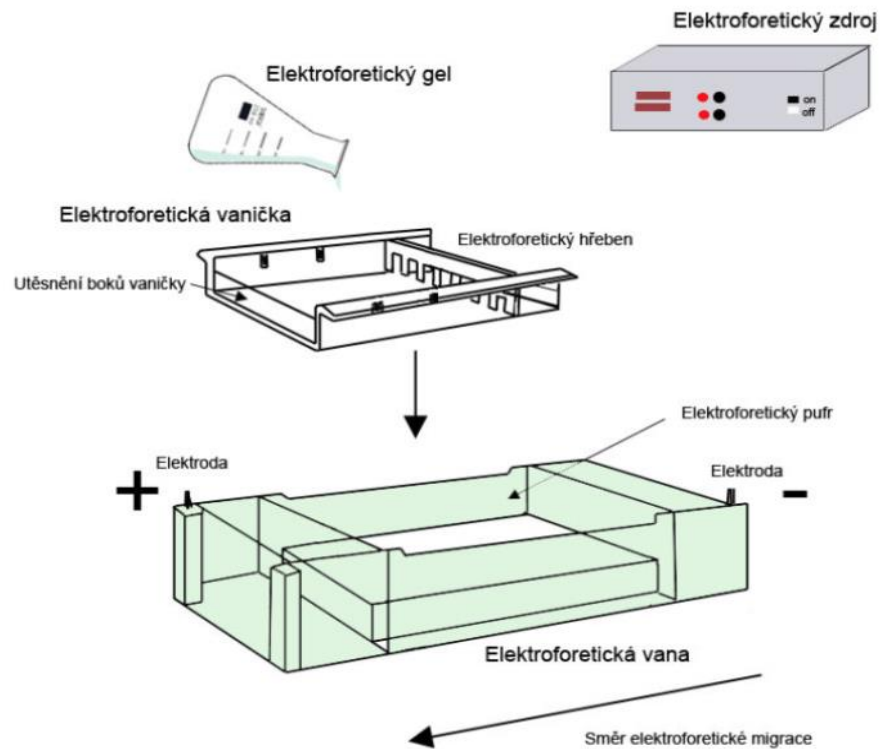
Na přípravu agarózového gelu se využívá agarózový prášek, který se následně zalije příslušným množstvím vhodného pufru. Nejčastěji se jedná o TAE či TBE pufr, zkratkou TAE je myšlen Tris-acetátový pufr a TBE je Tris-borátový pufr. Koncentrace gelu závisí na velikosti fragmentů DNA, většinou se pohybuje v rozmezí hodnot 0,5 % až 2 %. Suspenze agarózového prášku a pufru se posléze vkládá do mikrovlnné trouby či jiného ohřívacího zařízení, aby se tato směs postupně roztavila a agaróza se v pufru plně rozpustila. Po patřičném ochlazení se do gelu aplikuje interkalační fluorescenční barvivo, nejčastěji se jedná o ethidium bromid,

ale lze použít i méně zdravotně závadný SyberGreen. Avšak ethidium bromid se využívá nejčastěji, a to kvůli lepší dostupnosti a větší citlivosti. Alternativně lze obarvit gel až po elektroforéze, nicméně tento postup je spíše upozaděn (Lee et al., 2012, s. 2).

Do elektroforetické vany se vkládá vanička na tvorbu gelu, do níž se z nádoby, která se vkládala do mikrovlnné trouby, nalévá rozpuštěná agaróza. Po odstranění bublinek, které by rušily průběh elektroforézy, se do tohoto gelu vloží hřebínek pro tvorbu jamek a nechá ztuhnout při laboratorní teplotě. Tuhnutí závisí na hustotě gelu, avšak doba tuhnutí gelu odpovídá přibližně 20 min. Po uplynutí této doby dojde k vyjmutí hřebínku a zalití celé elektroforetické vany vodivým pufrem až po výšku elektrod. Nutností je, aby vanička s gelem byla pod hladinou pufru a musí být využit stejný pufr jako při přípravě gelu, poté se do příslušných jamek pipetují konkrétní vzorky, marker, pozitivní a negativní kontrola. Na závěr je elektroforetická vana překryta víkem, které nasedá na elektrody a pomocí vodivých kabelů se vana připojí k napájecímu zdroji. Elektroda, u které se nachází jamky se vzorky, se nazývá katoda a má negativní náboj, vlivem stejnosměrného elektrického pole dojde k pohybu vzorků ke kladné anodě. Po ukončení procesu elektroforézy se gel z vany vyjme a vloží do transiluminátoru, kde dochází k jeho osvětlení pomocí UV záření. Díky tomuto záření dojde ke vzniku fluorescence, kterou lze za pomoci transiluminátoru a příslušného softwaru zaznamenat v podobě jasného světelného proužku v dráze putujícího vzorku (Lee et al., 2012, s. 2).



Obrázek 8 Příklad elektroforeogramu, převzato od Vecilla et al., 2022, upraveno



Obrázek 9 Schéma aparatury pro agarózovou elektroforézu, převzato z Lab Guide, upraveno

1.12 Polymerázová řetězová reakce s polymorfismem délky restričních fragmentů

Polymerázová řetězová reakce s polymorfismem délky restričních fragmentů, zkráceně PCR-RFLP umožňuje charakterizovat amplikony PCR na principu specifického enzymatického štěpení – polymorfismu délky restričních fragmentů. PCR založená na 16S rRNA, využívá univerzální primery, jenž se váží na oblasti uložené ve všech bakteriích, napomáhá diagnostikovat různé závažné stavy jako např. meningitidu, sepsi či stavy, kdy organismy není možné kultivovat kvůli podanému antibiotiku před odběrem zkoumaného vzorku. Negativem u této techniky je, že pomocí PCR si sice ověříme přítomnost bakterie dle její DNA, ale není možné identifikovat typ či druh přítomného organismu. Nicméně pomocí kombinace PCR a RFLP lze dosáhnout již konkrétnějších informací. V genu 16S rRNA se vyskytují variabilní oblasti, které se využívají pro rozlišení bakteriálních druhů pomocí RFLP a dostupných informací o nukleotidových sekvencích (Rohit et al., 2016, s. 73).

1.12.1 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů

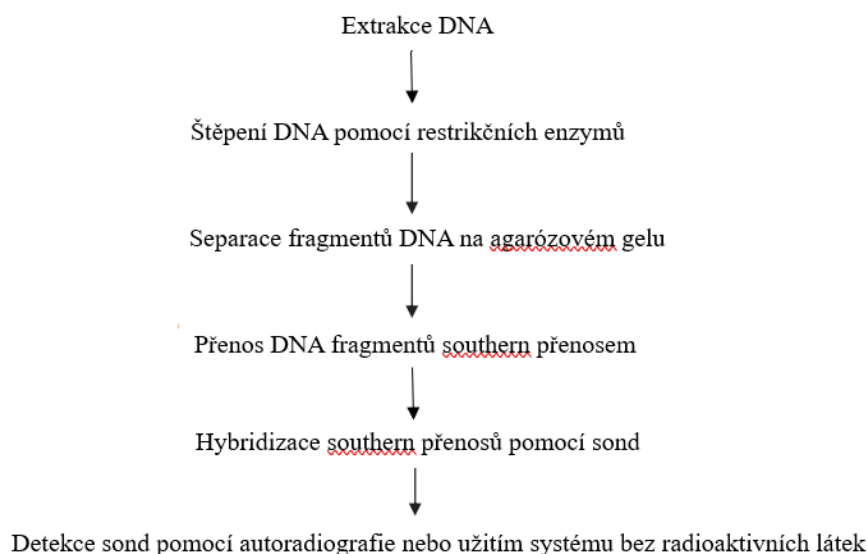
Polymorfismus délky restrikčních fragmentů, ve zkratce RFLP, je technologie vytvořená v roce 1984 anglickým vědcem Alecem Jeffreysem (Lee et al., 2013, s. 410) a využívá se k analýze jedinečných vzorů ve fragmentech DNA. Účelem této technologie je rozlišení drobných změn v sekvenci nukleotidů v homologních fragmentech DNA (Mittal et al., 2013, s. 190). Zároveň se tato technika využívá k nepřímému sběru dat o mutacích v restrikčních oblastech (Marwal et al., 2014, s. 291). Principem této techniky je specifická endonukleáz, které stříhají dvouřetězcovou molekulu DNA v místech, která spolehlivě rozpoznají. Tímto krokem dochází ke vzniku různě dlouhých homologních molekul DNA, které obsahují určité sekvenční odchylky, jinak zvané polymorfismy. Rozštěpené fragmenty lze posléze od sebe oddělit pomocí elektroforetických technik. Postup je v obecně je takový, že molekuly DNA, genomové, plazmidové či produkt PCR jsou inkubovány s restrikčními enzymy a vzniklý rozštěpený produkt se poté rozdělí na základě velikosti pomocí agarózové či polyakrylamidové elektroforézy (Mittal et al., 2013, s. 190).

Na začátku analýzy je však nutné nejprve extrahovat DNA ze vzorku, nejčastěji se jedná o krev, sliny, sperma či jiný materiál biologického původu. Po extrakci následuje proces purifikace (přečistění) a po ní se již vyextrahovaná a purifikovaná DNA inkubuje s restrikčními enzymy, které ji rozštípnou na specifické úseky, fragmenty. Restrikční fragmenty obsahují negativní náboj a je možné je posléze rozdělít pomocí gelové elektroforézy. V rámci separace putují restrikční fragmenty směrem ke kladné elektrodě, menší fragmenty se v gelovém prostředí pohybují rychleji a větší pomaleji. Výsledkem je vznik pásů, bandů, na základě velikosti a pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli (Marwal et al., 2014, s. 292). Rozdělené produkty je možné zviditelnit pomocí jakéhokoliv barviva, které má schopnost obarvit DNA, nejčastěji se využívá interkalační ethidium bromid. Dalšími možnostmi, jak lze zobrazit jednotlivé produkty, jsou fotografování či přenesení na nitrocelulózovou, ev. nylonovou membránu pro Southern blotting, případně extrakce z gelu a využití pro další techniky (Mittal et al., 2013, s. 190). Po zobrazení restrikčních fragmentů na gelu se na porézní podložku položí nylonová membrána a plastová maska. Gel se nasouvá na masku a poté se zapne vývěva, aby došlo k vytvoření podtlaku. Následně se membrána předhybridizuje (inkubace přes noc v rotační hybridizační peci při 65 °C). Po předhybridizaci se přistupuje k samotné hybridizaci za pomoci označené sondy – chemiluminiscenčně či radioaktivními látkami, výsledek je možné poté zobrazit např. pomocí luminiscenčních barviv (Marwal et al., 2014, s. 292) a lze jej vystavit rentgenovému filmu (Marwal et al., 2014, s. 291; Yang et al.,

2013, s. 2). Přenesení na nitrocelulózovou membránu RFLP je velice důležitou technikou při tzv. genetickém fingerprintingu, mapování genomu, určování rizika onemocnění, při testu paternity (Mittal et al., 2013, s. 190), identifikaci vzorků odebraných na místě činu a charakterizaci genetické diverzity či vzorců reprodukce určité populace zvířat (Marwal et al., 2014, s. 291). Tuto techniku je rovněž možné využít k odlišení dvou organismů či druhů (Mittal et al., 2013, s. 190).

1.12.2 Průkaz rodu *Capnocytophaga* metodou PCR-RFLP

Ciantar et al. (2005) ve svém článku popisuje jak metodou PCR-RFLP dokázal identifikovat rod *Capnocytophaga* a jeho druhy pomocí 16S rRNA. K tomuto experimentu využil sedm kmenů rodu *Capnocytophaga* z American Type Culture Collection (ATCC). Jednalo se konkrétně o druhy *C. gingivalis* (ATCC 33624), *C. ochracea* (ATCC 27872), *C. sputigena* (ATCC 33612), *C. granulosa* (ATCC 51502), *C. haemolytica* (ATCC 51501), *C. canimorsus* (ATCC 35979) a *C. cynodegmi* (ATCC 49044). Klinické vzorky byly odebrány pacientům s diagnózou chronické parodontitidy. Proto, aby mohla být stanovena tato diagnóza, musely být parodontální kapsy hlubší než 5 mm a radiograficky byl prokázán úbytek kosti. Vzorky po odběru byly umístěny do zkumavky s tryptikázovým sójovým bujónem, transportovány do laboratoře, sériově nařaděny a naočkovány na anaerobní agar (FAA). Inkubace probíhala za anaerobních podmínek po dobu 5 dnů. Na základě morfologie kolonií a negativního Gramova barvení byly indentifikovány kolonie rodu *Capnocytophaga*. Subkultivace kolonií probíhala na FAA inkubovaném při 37 °C v 5 % CO₂ po dobu 3 dnů (Ciantar et al., 2005, s. 2).



Obrázek 10 Schéma PCR-RFLP reakce, převzato od Marwal et al., 2014, upraveno

Extrakci bakteriální DNA provedli Ciantar et al. (2005) varu, 2 min. Resuspendovali několik bakteriálních kolonií ve sterilní vodě bez nukleázy ve zkumavkách značky Eppendorf, po uzavření a míchání došlo k vaření po dobu 2 min. Ihned po 2 min byly zkumavky přemístěny na led a provedeno ředění 1:10 ve sterilní vodě bez nukleázy. Vyextrahovaná DNA pak posloužila jako matrice pro PCR reakci. Po přidání komerčně dodávaných primerů, *Taq* polymerázy a master mixu, se provedla PCR amplifikace, celkem dvě reakce. Jedna byla použita pro test 16S rRNA PCR-RFLP a druhá pro sekvenování genu 16S rRNA. Jako pozitivní kontrola byla použita *Escherichia coli* a negativní kontrola zahrnovala použití sterilní vody bez nukleázy. PCR reakce probíhala za podmínek 95 °C 5 min, 29x 94 °C 1 min, 54 °C 1 min a 72 °C 1 min. Nakonec proběhla doba prodloužení 72 °C 5 min. Pro vyhodnocení výsledku se provedla agarózová gelová elektroforéza, která probíhala na 0,8% agarózovém gelu s ethidium bromid a vždy bylo nanášeno 10 µl produktu. Pro odečtení výsledku se využil marker molekulové hmotnosti velikosti 2000–50 bp. Elektroforéza probíhala v prostředí Tris-acetátového EDTA pufru při 70 V. Pro vizualizaci gelu se využil UV transiluminátor (Ciantar et al., 2005, s. 2).

Po PCR se provedlo štěpení za pomoci restrikčních endonukláz (dodané ve směsi) v prostředí pufru ve sterilních zkumavkách typu Eppendorf. Po promíchání, odstředění a inkubaci směsi restrikčních endonukleáz při 37 °C se opět provedla vizualizace výsledných 16S rRNA PCR-RFLP štěpů na superjemném 2% agarózovém gelu s ethidium bromid. Pro odečtení výsledku byl využit tentýž marker molekulové hmotnosti a vizualizace fragmentů proběhla opět za pomoci UV transiluminátoru (Ciantar et al., 2005, s. 2).

Další studie zabývající se výskytem orálních druhů *Capnocytophaga* spp. v zubním plaku pochází od Idate et al. z roku 2020. V jejich případě rozdělili skupinu 300 pacientů, 150 mužů a 150 žen, na 3 podskupiny, a to na pacienty se zdravými dásněmi, s gingivitidou a parodontitidou. Idate et al. (2020) výsledky analýzy statisticky zhodnotili a uvedli, že z původních testovaných 7 druhů byly prokázány pouze 3 – *C. gingivalis*, *C. ochracea* a *C. granulosa*. *C. gingivalis* byla prokázána u 30 jedinců, procentuální zastoupení tedy činilo 10,0 %, *C. ochracea* byla identifikována u 109 jedinců, procentuálně se tedy jednalo o 36,3 % a *C. granulosa* u 98 jedinců, tj. 32,7 %. Druhy *C. sputigena*, *C. haemolytica*, *C. genospecies* a *C. leadbetteri* prokázány nebyly. V rámci porovnání procentuálního výskytu z hlediska orálního zdraví se *C. ochracea* prokázala ve 40,0 % u pacientů se zdravými dásněmi, ve 32,0 % u pacientů s diagnostikovanou gingivitidou a ve 37,0 % s prokázanou parodontitidou. Výskyt

C. gingivalis se prokázal u 8,0 % pacientů se zdravými dásněmi, ve 12,0 % u pacientů s gingivitidou a v 10,0 % u pacientů s parodontitidou. *C. granulosa* se prokázala u jedinců se zdravými dásněmi v 39,0 %, s gingivitidou v 33,0 % a s parodontitidou v 26,0 %.

Tabulka 6 Shrnutí výsledků studie dle Idate et al., z roku 2020

<i>C. ochracea</i>		
Zdravé dásně	Gingivitida	Parodontitida
40,0 %	32,0 %	37,0 %
Celkový výskyt 36,3 %		
<i>C. gingivalis</i>		
Zdravé dásně	Gingivitida	Parodontitida
8,00 %	12,00 %	10,00 %
Celkový výskyt 10,0 %		
<i>C. granulosa</i>		
Zdravé dásně	Gingivitida	Parodontitida
39,0 %	33,0 %	26,0 %
Celkový výskyt 32,7 %		

Poznámka: vlastní tabulka pro lepší přehlednost výsledků

1.13 Laserová desorpce/ionizace za účasti matrice s analyzátozem doby letu

Laserová desorpce/ionizace za účasti matrice s analyzátozem doby letu (MALDI-TOF) je jednou z technik hmotnostní spektrometrie pro oblasti proteomiky a metabolomiky, která se v poslední době začíná ve větší míře uplatňovat i v klinické praxi. MALDI-TOF je metodika založená na principu hmotnostní spektrometrie (MS), která se v současnosti využívá zejména ve dvou hlavních oblastech, a to při hledání nových diagnostických biomarkerů pomocí proteomických analýz a při testování v klinické mikrobiologii. Tato technologie se ukázala jako velice schopná a spolehlivá pomoc při diagnostice a léčbě infekčních onemocnění, která vyžadují rychlého jednání. V roce 1988 Tanaka et al. představili technologii založenou na měkké laserové desorpci, díky čemuž nedocházelo při ionizaci k destrukci proteinů. V návaznosti na tento objev v roce 1994 Cain et al. provedli profilaci proteinu s MALDI-TOF pomocí kyseliny α -kyano-4-hydroxyskořicové coby matrice, umožnilo to rychlou identifikaci

a tato kyselina se tak stala zlatým standardem při analýzách a vyšetřeních (Tsuchida et al., 2020, s. 2).

1.13.1 Průběh identifikace bakterií užitím MALDI-TOF

Izolovaná kolonie vybrané bakterie z kultivačního média sterilní tyčinkou přenese na vzorkovou destičku (Tsuchida et al., 2020, s. 2). Mikrobiální vzorky, které jsou nanesené na destičce jsou nejprve překryty matricí, po zaschnutí vzájemně kokrytalizují a poté se vloží do hmotnostního spektrometru k analýze (Dingle a Butler-Wu, 2013, s. 1). Jak bylo již výše zmíněno, jako matrice se nejčastěji využívá kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA). Tato kyselina účinně absorbuje energii laseru, čímž brání rozkladu vzorku a podporuje ionizaci vzorku poskytováním protonů. Laserem se ostřeluje destička se vzorkem a matricí a dochází k ionizaci proteinů, zejména ribosomálních, ve vybraném místě (spotu). Po ionizaci následuje měření doby, za kterou tyto ionizované částice doletí k detektoru na konci průletového analyzátoru. Díky tomu je možné určit poměr hmotnosti a náboje (m/z) dané částice. Vhodný počítačový software poté vynese poměr hmotnosti a náboje jako odezvu měření ve formě tzv. píku. Po analýze vzorku dochází k tvorbě celého spektra píků, které se následně porovnávají se spektrem v referenční databázi. Jednotlivé spektrální vzorky jsou pro organismus jedinečné, nicméně v rámci příslušnosti k určitému bakteriálnímu druhu lze nalézt řadu píků, které jsou pro tyto organismy společné a můžeme je tak víceméně spolehlivě zařadit. MSP neboli hlavní spektrální profily jsou schematicky uspořádané spektrální vzory velkého množství známých kmenů, které je možné nalézt v databázi a s těmito spektry lze porovnávat spektrum vybrané bakteriální kolonie. Na základě nejvyšší podobnosti lze bakterii identifikovat (Tsuchida et al., 2020, s. 3).

Izoláty z kultury lze rovněž identifikovat pomocí 16S či sekvenací celého genomu, to je však poměrně finančně i časově náročná záležitost, proto se v praxi častěji využívá MALDI-TOF. Mezi hlavní důvody se řadí zejména úspora času, který je při určitých situacích rozhodující. Nicméně rozlišení a shoda z hlediska identifikace komenzálních bakterií je horší, neboť stále máme omezené záznamy dat v databázi (Asare et al., 2023, s. 1). Pomocí MALDI-TOF lze s vysokou přesností určit střevní bakterie a další gramnegativní tyčinky, avšak identifikace grampozitivních bakterií jako jsou stafylokoky, kvasinky či enterokoky je stále dosti omezená (Tsuchida et al., 2020, s. 3).

1.13.2 Průkaz rodu *Capnocytophaga* technikou MALDI-TOF

V článku od Algahawi et al. (2024) shrnují, jak byla provedena identifikace druhů *Capnocytophaga* technologií MALDI-TOF. Uvádí, že bylo vybráno celkem 27 klinických bakteriálních kmenů, které byly původně izolovány ze vzorků zubního plaku populace zdravých kavkazských žen. Za pomoci morfologie kolonií a biochemických testů byly označeny jak *Capnocytophaga* spp. Pro testy byly všechny kmeny subkultivovány v dubletu na neselektivních brucelových agarových plotnách doplněných heminem o koncentraci 5 µg/ml a vitamínem K1 o koncentraci 10 µg/ml. Inkubace probíhala v anaerobní komoře s atmosférou 10 % H₂, 5 % CO₂ a 85 % N₂ při teplotě 37 °C, vzhledem k pomalému růstu, byly tyto bakterie inkubovány ve dvou sadách v různých časech – 48 a 96 h. Zároveň uvádějí, že dle pokynů výrobce se každá skupina musela v souladu s protokolem nanést v trojím opakování na nerezové destičky MALDI-TOF MS. Po 48 h inkubace nanесли 2–3 kolonie ve třech opakováních na vyhrazená místa na 2 nerezové destičky. Jednu destičku využili pro přímou extrakci a druhou pro extrakci kyselinou mravenčí. Následně byly kolonie každého kmene odebrány a analyzovány pomocí dvou přístrojů MALDI-TOF MS s opakovací frekvencí laseru 60 Hz a 120 Hz.

Výsledek srovnání inkubačních dob pro jednotlivé druhy prokázal, že identifikace na úrovni rodu byla průkaznější po 48 h (96 %) než po 96 h (92 %), ale z hlediska druhového porovnání nebyl rozdíl mezi oběma dobami příliš velký, lze říci srovnatelný (71,5 %). Nicméně u druhu *Capnocytophaga haemolytica* neproběhla identifikace po 48 h inkubace, tento druh vyžadoval pro svůj růst delší dobu inkubace. Metoda přímého stanovení a extrakce kyselinou mravenčí pomohly identifikovat 97 % kmenů z hlediska rodů. Metoda, využívající pro identifikaci kyselinu mravenčí, umožnila lepší rozlišení *Capnocytophaga haemolytica* od *Capnocytophaga granulosa* na úrovni druhové (Algahawi et al., 2024, s. 7–10).

1.14 Sekvenování

DNA sekvenování je technika sloužící k určení nukleotidové sekvence DNA (Clarridge, 2004, s. 2). Proces sekvenování můžeme rozdělit na 3 základní fáze, a to na fázi přípravy vzorku, sekvenování a opětovného sestavení. Při přípravě vzorku je nutné si rozdělit cílový genom na několik menších fragmentů. Dle množství vzorku mohou, ale i nemusí být tyto fragmenty amplifikovány. V průběhu sekvenování jako takového se jednotlivé báze identifikují v určitém pořadí a toto pořadí definuje délku sekvence. V závěrečné fázi, tj. fázi opětovného sestavení, se přistupuje k zarovnání překrývajících se sekvencí pomocí bioinformatických

softwarů (Schadt et al., 2010, s 228). Ve článku Schadt et al., z roku 2010 uvádí, že existují tři generace sekvenování. Sekvenování první generace, sekvenování druhé generace a sekvenování třetí generace (Schadt et al., 2010, s 228).

Technologie sekvenace DNA jsou silnými nástroji, které na základě Sangerova sekvenování (sekvenování první generace) povýšily molekulární vědy na vyšší úroveň (Aly et al., 2015, s. 261). V roce 1977 vytvořil Frederick Sanger technologii dnes zvanou jako Sangerovo sekvenování, jehož základem byla metoda terminace řetězce (Liu et al., 2012, s. 1). V roce 1977 Maxam a Gilbert posléze vyvinuli technologii sekvenování, která spočívala v chemické modifikaci DNA (Schadt et al., 2010, s 228), následném štěpení na specifických bázích (Liu et al., 2012, s. 2) a separaci gelovou elektroforézou (Pareek et al., 2011, s. 414).

Sangerovo sekvenování bylo přijato jako hlavní sekvenační technologie v první generaci sekvenačních aplikací, neboť bylo technicky jednodušší a lépe se rozšiřovalo (Schadt et al., 2010, s 228). Nicméně sekvenování bylo poměrně náročnou záležitostí, a to z důvodu využití radioaktivních materiálů. V horizontu pár desítek let byla tato náročná technologie nahrazena sekvenačními přístroji s využitím kapilární elektroforézy, která zajišťovala rychlejší a přesnější sekvenaci (Liu et al., 2012, s. 1). Sangerovo sekvenování v dnešním pojetí pracuje v průběhu přípravy vzorků s různou velikostí fragmentů, které začínají vždy na stejném místě a končí bázi dNTD (dideoxynukleotidem), která je značena jednou ze čtyř fluorescenčních značek, jež odpovídá dané bázi. Posléze jsou všechny fragmenty rozděleny dle délky pomocí kapilární elektroforézy. Díky koncové bázi je poté možné zpětně určit celou sekvenci (Schadt et al., 2010, s 228).

Sekvenování druhé generace navazovalo na sekvenátory první generace, které již nedostačovaly požadavkům. Na rozdíl od první generace sekvenátory druhé generace měly mnohem vyšší propustnost, a to díky paralelnímu sekvenování velkého počtu molekul DNA. Další změnou oproti první generaci bylo značení vzniklých pyrofosfátů pomocí dvouenzymového procesu za využití luminiscence, nikoliv již radioaktivní či fluorescenční značení dideoxynukleotidů. Průběh syntézy pyrofosfátů sestával ze dvou kroků: přeměny pyrofosfátu za katalýzy ATPsulfurylázy na ATP, který posléze sloužil jako substrát pro enzym luciferáza. Za pomoci luciferázy vzniklo světlo, které odpovídalo množství pyrofosfátu. Tento vizualizační mechanismus poté přispěl k odvození sekvence měřením produkce pyrofosfátů. Každý nukleotid se následně promýval přes templátovou DNA, která byla připevněná k pevné fázi (Heather et al., 2016, s. 6). U sekvenátorů druhé generace se rovněž vyskytovala

technologie wash-and-scan, kdy se vybraná vlákna DNA zaplavila značenými nukleotidy, které se následně zakomponovaly do těchto vláken a přebytek nukleotidů se posléze vymyl. Na závěr se zakomponované báze oskenovaly, zafixovaly a připravily se nové templáty pro další cyklus. Cyklus se opakoval tak dlouho, dokud bylo možné reakci provádět. Čas potřebný pro dosažení požadovaného výsledku u sekvenátorů druhé generace byl delší, neboť bylo zapotřebí velkého počtu cyklů skenování a praní (Schadt et al., 2010, s 228).

Po sekvenování druhé generace následovalo sekvenování třetí generace. Dodnes se vyskytují dohady o tom, kde se přesně nachází rozhraní mezi těmito dvěma druhy sekvenování, nicméně určujícími znaky sekvenování třetí generace by mělo být sekvenování jedné molekuly (SMS), sekvenování v reálném čase a měly by se určitým způsobem lišit od předchozích technologií (Heather et al., 2016, s. 8). V článku od Heather et al. z roku 2016 zahrnují do technologií třetí generace ty, které jsou schopné sekvenovat jednotlivé molekuly, což ve své podstatě potírá princip amplifikace DNA uváděný všemi předchozími technologiemi. Technologie SMS pracovala na principu promývání fluorescenčního reverzibilního terminátoru dideoxynukleotidu za pomoci báze. Následně docházelo k vizualizaci a posléze ke štěpení a cyklování další báze, zatímco v průběhu celé reakce byl DNA templát připojený k planárnímu povrchu. Jednalo se tak o první technologii, která dokázala sekvenovat DNA, která nebyla předem naamplifikována. Sofistikovanější technologie sekvenování v reálném čase s jednou molekulou, se zkratkou SMRT, umožňovalo sledovat jednotlivé molekuly DNA polymerázy při syntéze DNA. Metoda SMRT probíhala v polích mikrofabrikovaných nanostruktur – vlnovody s nulovým režimem, zkratka ZMW. Tyto vlnovody působily dojmem malých dírek v kovovém filmu umístěné na čipu. Principem byl rozpad světla a osvit samotného dna dírek, a to vlivem jejich malého průměru, což umožňovalo zobrazit jednotlivé molekuly fluoroforu blízko ZMW (Heather et al., 2016, s. 9). Aby bylo dosaženo kýžených výsledků v reálném čase, bylo zapotřebí vyřešit dva důležité problémy. Zaprvé zajistit dostatečně malý objem k dosažení ideálního poměru signálu a šumu, aby bylo možné přesně označit báze po jejich nasednutí do matrice. Zadruhé označit ty nukleotidy, které by se měly účastnit syntézy, a to takovým způsobem, že by se barevně značený linker po začlenění odštěpil, aby vlákno DNA mohlo dále pokračovat v syntéze a nedrželo se v něm více barviv najednou. V důsledku toho by docházelo k narušení poměru signál/šum (Schadt et al., 2010, s 231).

1.15 16S rRNA

V 80. letech 20. století vědci objevili, že vzájemné vztahy jednotlivých bakterií z hlediska vývoje lze určit pomocí porovnání stabilních částí genetického kódu. Geny, které vědci zahrnuli do skupiny stabilních částí, kódovaly 5S, 16S a 23S rRNA. K těmto úsekům dále ještě spadaly oblasti mezi těmito geny. Gen, který dosáhl nejvyššího uplatnění, byl gen 16S rRNA, jenž se využívá i v současnosti pro taxonomické zařazení a rozdělení bakterií. 16S rRNA lze využívat pro porovnávání nejen bakterií, ale dokonce i pro srovnání s archebakteriemi a s genem 18S rRNA eukaryot (Clarridge, 2004, s. 840). Gen 16S rRNA je poněkud univerzálním genem a je vysoce konzervovaný, to znamená, že jej lze využít pro stanovení a přesnou identifikaci bakteriálních izolátů (Ciantar et al., 2005, s. 1894).

Sekvence genu 16S rRNA je dlouhá přibližně 1550 bp a skládá se z variabilních a konzervovaných oblastí. Rozlišení druhů je možné za pomoci identifikace interspecifických polymorfismů genu 16S rRNA. Primery, které lze označit za univerzální, se volí komplementárně ke konzervovaným oblastem na začátku genu či na jeho konci, tj. v okolí hodnot 540 bp či 1550 bp. Sekvence ve variabilní části se využívá v taxonomii ke srovnávání. Kromě schopnosti rozlišit organismy na úrovni rodové, lze rozdělit tyto rody i na druhy a poddruhy. Mnohdy není zapotřebí provádět sekvenaci celého úseku 1500 bp, neboť většina diferenciačních znaků potřebných pro odlišení druhů by se měla vyskytovat právě v oblasti okolo 500 bp. Nicméně v pozdějších testech se ukázalo, že vzájemné vztahy mezi druhy jsou v podstatě stejné s jakoukoliv délkou, tudíž preference volby oblasti 500 bp pro sekvenaci je spíše z hlediska ekonomického (Clarridge, 2004, s. 842).

1.15.1 Průběh sekvenace 16S rRNA

Proces sekvenování 16S rRNA obecně zahrnuje tyto kroky: izolace bakteriální DNA ze vzorku, amplifikace genu 16S rRNA pomocí PCR, sekvenování amplifikovaného genu 16S rRNA a porovnání sekvence s databází známých sekvencí za účelem identifikace bakterie. Genomová DNA bakterie se extrahuje z celých buněk pomocí standardních metod či pomocí komerčních systémů jako jsou PrepMan DNA extrakční činidlo či ABI. Vyextrahovaná DNA slouží jako templát pro PCR reakci k amplifikaci úseku 500 či 1500 bp sekvence genu 16S rRNA (Clarridge, 2004, s. 844). Zmnožení genu 16S rRNA pomocí PCR umožní vytvářet vysoký počet jeho kopií, které se využívají pro identifikaci bakterií (Ciantar et al., 2005, s. 1894). Po amplifikaci dochází k využití univerzálních primerů, které jsou komplementární ke konzervovaným oblastem, tudíž lze amplifikovat tuto oblast z libovolné bakterie.

Po ukončení amplifikace se amplikony purifikují, a to z důvodu odstranění redundantních primerů a nukleotidů. Pro purifikaci se většinou využívají komerční kity. Po ukončení purifikace se přistupuje již k samotnému sekvenování cyklů. Toto sekvenování využívá, podobně jako v případě PCR, DNA jako templát, konkrétně se jedná o purifikované amplikony prvního cyklu PCR reakce. Dopředné i reverzní sekvence lze využít jako templát při samostatných reakcích. Sekvence cyklů se od PCR odlišuje povahou matrice a produktem. V rámci matrice totiž platí, že se jedna a ta samá použije po celou dobu přednastaveného programu, většinou se jedná přibližně o 25 cyklů. Další odlišnost tkví v délce produktu, protože výsledkem je směs DNA o různých délkách, které se dosáhne pomocí značených bází zvaných terminátory. Tyto terminátory ukončují sekvenci a bývají začleněny do DNA náhodně. Výsledek lze tedy změřit pomocí fluorometru, neboť každá ze čtyř bází obsahuje jinou fluorescenční značku, která absorbuje světlo o jiné vlnové délce (Clarridge, 2004, s. 4). Pro odstranění nezačleněných terminátorů barviva se produkty purifikují a jejich délky se rozdělí pomocí kapilární elektroforézy či gelovou elektroforézou. Sekvenci jednotlivých bází jsme tedy schopni určit tím, že víme koncovou bázi každého fragmentu a jejich délku. Obě vlákna DNA jsou sekvenována odděleně, což má za následek tvorbu přímé i zpětné sekvence (Clarridge, 2004, s. 844).

1.15.2 Průkaz rodu *Capnocytophaga* sekvenací 16S rRNA

Ciantar et al. (2005) ve svém článku z roku uvádějí možnost identifikace bakterie rodu *Capnocytophaga* nejen za pomoci metody PCR-RFLP ale i za využití sekvenačních metod. Po provedení již výše popsané PCR reakce se amplikony purifikovaly sadou QIAGEN a sekvenovaly za pomoci cyklické sekvenační sady ABI Prism BigDye Terminator sequencing kit a primeru 357f. Po osekvenování proběhla opět purifikace produktů, a to metodou srážení za využití ethanolu. Sekvenační separace proběhla v automatickém DNA sekvenátoru a výsledek byl zobrazen pomocí softwaru Chromas. Výsledek se poté porovnával s databázemi, ale pouze sekvence o velikosti 300 bází a více byly srovnány s databázemi genů 16S rRNA v Ribosomal Database Project (RDP-II). Produkty byly rovněž zpracovány základním nástrojem pro vyhledání lokálního zarovnání (BLAST)(Ciantar et al., 2005, s. 1895).

1.16 Kultivační průkaz orálních druhů *Capnocytophaga*

1. studie

Odběr vzorků, kultivace

Pushpa et al. (2016) odebrali vzorky zubního plaku ze subgingiválních oblastí spodiny gingiválního sulku či parodontální kapsy pomocí sterilních kyret. Vzorek od každého jedince okamžitě po odebrání přenesli do RTF transportního média a odeslali do laboratoře. Vzorky zubního plaku inokulovali na KA a TBBP agar, který je selektivním médiem pro *Capnocytophaga*. Kultivace probíhala v 10 % CO₂ po dobu 24–72 h. Po uplynutí doby kultivace sledovali patrnou pohyblivost určitých kolonií na KA, tato skutečnost napomohla identifikaci rodu *Capnocytophaga* stejně jako barvení dle Grama, které jejich přítomnost potvrdilo.

Výsledky

Ve studii od Pushpa et al. z roku 2016 využívali pro kultivaci orálních druhů rodu *Capnocytophaga* KA a TBBP agar. TBBP je tryptikázový sójový agar s antibiotiky bacitracinem a polymyxinem. Pushpa et al. (2016) ve svém článku rozdělili pacienty do tří skupin, a to na pacienty se zdravým parodontem, s diagnostikovanou gingivitidou a diagnostikovanou parodontitidou. Kritéria pro zařazení do skupiny se zdravým parodontem byly nepřítomnost jakýchkoli klinických příznaků zánětu dásní, hloubka sondy ≤ 3 mm a žádná ztráta attachmentu. Pro pacienty zařazené do kategorie s diagnostikovanou gingivitidou platil výskyt klinických příznaků zánětu dásní, hloubka sondy ≤ 3 mm a žádná ztráta attachmentu. Pro skupinu s diagnostikovanou parodontitidou naopak platila tato kritéria jako přítomnost klinických příznaků gingiválního zánětu, hloubka sondáže ≥ 5 mm a ztráta attachmentu ≥ 3 mm. V každé skupině se nacházelo 40 pacientů. Bakterie *Capnocytophaga* spp. byla kultivačně prokázána u 11 pacientů ze 40 se zdravým parodontem, tj. 27,5 %, dále u 21 pacientů ze 40 s diagnostikovanou gingivitidou, tj. 52,5 % a u 12 pacientů ze 40 s diagnostikovanou parodontitidou, tj. 30,0 %.

2. studie

Odběr vzorků, kultivace

V této studii od Idata et al. z roku 2018 provedli odběr vzorků subgingiválního zubního plaku pomocí kyrety. Tento materiál ihned vložili do RTF a transportovali do laboratoře ke zpracování. V laboratoři se nejprve získaný vzorek v RTF tekutině vortexovali, aby se získaný plak rozbil na malé částičky a bakterie se uvolnily do média. Následně provedli kultivaci na

KA (Dentaid media) a TBBP agaru při 5–10 % CO₂ po dobu 72 h. Po uplynutí doby kultivace pozorovali nárůst bakterií a jejich charakteristickou pohyblivost na KA. Vzhled kolonií odpovídal béžové až žlutooranžové barvě s plochým profilem. Pro potvrzení přítomnosti gramnegativních fusiformních tyčinek provedli barvení dle Grama.

Biochemické testy

Pro fenotypovou identifikaci provedli rovněž testy na přítomnost katalázy, oxidázy, fermentaci glukózy, laktózy, sacharózy, maltózy, manózy, fruktózy, amygdalinu, celobiózy, salicinu, manitolu, sorbitolu, melibiózy, inulinu a rafinózy. Na závěr provedli test redukce dusičnanů a hydrolýzu eskulinu, močoviny, škrobu a želatiny.

Výsledky

Idate et al. (2018) ve své práci prováděli kultivačně průkaz vybraných druhů rodu *Capnocytophaga* v dutině ústní skupiny 150 dobrovolníků. Tyto dobrovolníky rozdělili do 3 skupin, v tomto případě po 50 osobách. Tyto skupiny byly rozlišeny rovněž na základě stavu dutiny ústní dobrovolníků. První skupinu tvořili ti, jejichž dutina ústní nevykazovala žádné patologie, druhou skupinu tvořili lidé, kterým byla potvrzena diagnóza gingivitidy a třetí skupinu tvořili dobrovolníci, kteří trpěli parodontitidou. Podmínky pro zařazení jedince do kategorie se zdravým parodontem byly žádné příznaky zánětu dásní, hloubka sondáže ≤ 3 mm a rovněž žádný ztráta attachmentu. Pacienti s gingivitidou museli splňovat následující kritéria přítomnost klinických příznaků zánětu dásní, hloubka sondáže ≤ 3 mm a žádná ztráta attachmentu. Pacienti spadající do kategorie s diagnostikovanou parodontitidou museli projevovat generalizované klinické příznaky zánětu dásní, hloubka sondáže musela být ≥ 5 mm a ztráta attachmentu ≥ 3 mm. Věkové rozmezí celkového počtu 150 dobrovolníků bylo 22–55 let. Další rozdělení účastníků proběhlo na základě pohlaví. Kultivace vzorků probíhala na agarech po dobu 72 h za podmínek 5–10 % CO₂. Zhodnocení vzhledu kolonií, charakteru růstu na půdách, hemolýzy, motility, Gramova barvení a testy na katalázu a oxidázu dopomohly identifikaci jednotlivých druhů rodu *Capnocytophaga*. Výsledky ukázaly, že studie se účastnilo celkem 65 mužů a 85 žen, tj. 43,3 % zastoupení mužů a 56,6 % žen. Bakterie *Capnocytophaga* byla prokázána pouze ve 28 vzorcích ze 150, procenty to odpovídá přibližně 18,7 %. Ze 7 druhů bylo prokázáno pouze 5, a to *C. gingivalis*, *C. ochracea*, *C. granulosa*, *C. genospecies* a *C. leadbetteri*, avšak *C. sputigena* a *C. haemolytica* prokázány nebyly. U zdravých jedinců se *C. gingivalis*, *C. ochracea* a *C. granulosa* vyskytovaly v 15 případech, 30,0 %, v případě

jedinců s diagnostikovanou gingivitidou se jednalo o 7 případů, 14,0 % a zbylých 6 případů, tj. 12,0 %, připadlo na jedince trpících parodontitidou. Výskyt *C. gingivalis* odpovídal 8 případům, 5,3 %, *C. ochracea* 10 případům, 6,7 % a *C. granulosa* 7 případům, to odpovídá 4,7 %.

2 PRAKTICKÁ ČÁST

2.1 Cíl práce

1. Vypracovat dotazník určený pro klienty poskytující vzorek z dutiny ústní.
2. Zpracovat vzorky z dutiny ústní metodami kultivačními a molekulárně biologickými.
3. Výsledky zpracovat do přehledných tabulek.
4. Vyhodnotit získané výsledky a porovnat s publikovanými údaji.
5. Diplomovou práci zpracovat v souladu se směrnicí č. 7/2019 Univerzity Pardubice
”Pravidla pro odevzdání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací”

2.2 Přístroje a vybavení

Tabulka 7 Tabulka přístrojů a vybavení

Přístroj	Typ a země původu
Analytické váhy	Kern, Německo
Autokláv	PS 20 A, BMT, Česká republika
Autokláv	BMT STERILAB [®] , Česká republika
Autokláv	BMT STERILAB [®] PLUS, Česká republika
Digitální laboratorní váhy	SCALTEC
Digitální laboratorní váhy	440-43 Kern, Německo
DNA/RNA UV-dekontaminační box	UVC/T-AR, Biosan, Lotyšsko
Horkovzdušný sterilizátor	Sterimat 5104, Stigma, USA
Chladnička	Guzzanti GZ 340 A Itálie/Německo
Chladnička s mrazničkou	AEG Santo SCS71800C0, Německo
Chladnička s mrazničkou	Gorenje, NRC6204SW4, Slovinsko
Chladnička s mrazničkou	BOSCH, Německo
Chlazený inkubátor	Q-Cell 240/40 basic, Polsko
Laminární box	MSC12. Jouan, Francie
Laminární box	MSC9. Jouan, Francie
Mikroskop	Nikon H600L, Japonsko
Mikrovlnná trouba	LG, Jižní Korea
Mini Gel systém B2	Owl Separation Systems, Spojené státy americké
Mini Gel systém B1A	Owl Separation Systems, Spojené státy americké
Monitor	Sony, SDM-S51, Japonsko
Napájecí zdroj	PowerPRO CleaverScientific LTD, Spojené království
Odstředivka	Sprout [®] plus mini, Česká republika

Počítač	Dell OptiPlex 3020, Spojené státy americké
Termoblok	SBH200DC, Stuart®, UK
Termocykler	TProfessional, Biometra, Německo
UV transluminátor	Vilber Lourmat, Francie
Vortex	MS 3 basic, Ika, Německo

2.3 Laboratorní pomůcky

Automatické pipety, kahan, mikrozkušavky typu Eppendorf 1,5 ml, mikrozkušavky typu Eppendorf 0,2 ml, 1 µl očkovací klíčky, plastové špičky, 10 ml plastové zkumavky, kovové stojany na zkumavky, stojany pro zkumavky typu Eppendorf 1,5 ml, stojany pro zkumavky typu Eppendorf 0,2 ml, nůžky, pinzety, sterilní výtěrový tampón s transportním médiem Amies s aktivním uhlím, AnaeroGen™ Compact vyvíječ plynu, Thermo Scientific™ Oxoid™ AnaeroJar™ 2,5 litru, alkoholový dezinfekční prostředek Desam Spray, Petriho misky, skleněný odměrný válec 100 ml, skleněný odměrný válec 500 ml, skleněný odměrný válec 900 ml, elektroforetická vana, hřebínek, zdroj napětí

2.4 Kultivační média

Krevní agar HiMedia (modifikovaný)

Tabulka 8 Složení modifikovaného krevního agaru

Proteosový pepton	15,0 g/l
Játrový extrakt	2,5 g/l
Kvasničný extrakt	5,0 g/l
Chlorid sodný	5,0 g/l
Agar	15,0 g/l
Konečné pH 7,4 ± 0,2 při 25 °C	

Příprava: Ve 300 ml destilované vody se rozpustí 12,75 g dehydratovaného média Blood Agar Base No. 2. Směs se sterilizuje v autoklávu při 120 °C po dobu 20 minut, 215 kPa. Po zchladnutí se k této kultivační půdě přidá 10 % (30 ml) defibrinované beraní krve a antibiotikum gentamicin. Médium se následně rozlévá do Petriho misek a po ztuhnutí a zaschnutí se ukládá do lednice, kde se skladuje. Antibiotikum gentamicin se připravuje rozpuštěním prášku gentamicinu ve sterilní destilované vodě, přípravou zásobního roztoku dosáhneme koncentrace 100 mg/ml. Zásobní roztok antibiotika se posléze přidává ke krevnímu agaru, čímž je dosaženo celkové koncentrace 20 µg/ml.

Brain Heart Infusion Broth

Tabulka 9 Složení Brain Heart Infusion Broth

Mozková infuze v pevné formě	12,5 g/l
Hovězí srdcová infuze v pevné formě	5,0 g/l
Proteosový pepton	10,0 g/l
Glukóza	2,0 g/l
Chlorid sodný	5,0 g/l
Fosforečnan sodný	2,5 g/l
Konečné pH 7,4 ± 0,2 při 25 °C	

Příprava: Ve 200 ml destilované vody se rozpustí 7,4 g dehydratovaného média. Směs se následně sterilizuje v autoklávu při 120 °C 20 minut, 215 kPa.

2.5 Reagencie a chemikálie

Agaróza (Sigma)

Příprava: pro vznik 1,5% gelu se naváží 1,2 g agarózy, která se rozpustí v 80 ml 1x TBE

Combi PPP Master mix (Top-Bio)

Dodává se 2x koncentrovaný roztok: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25 °C), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, monoklonální protilátka anti-Taq (38 nM), barvivo, stabilizátory a aditiva

DNA marker 155-970 coloured (Top-Bio)

Koncentrace: 1 µg DNA/12 µl pufru (25 mM potassium acetate, 10mM Tris acetate a 25 mM EDTA). Balení obsahující 25 µg restrikčních fragmentů ve 300 µl pufru. Jedno balení umožní přípravu 30 analýz

DNA marker 100-500 coloured (Top-Bio)

Koncentrace: 12 µg DNA/ml pufru (10 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, aditiva). Balení 1 zkumavka obsahující 3,6 µg DNA fragmentů ve 300 µl pufru. Jedno balení umožní přípravu až 120 markerů (2,5 µl markeru/vzorek).

Ethanol 96 % (Penta Chemicals)

Obsah: min. 95,4–96,8 %, hustota (20 °C) 0,8042–0,8098 g/cm³

Ethidium bromid (Top-Bio)

Koncentrace: roztok ethidium bromidu (10 mg/ml) v PCR H₂O v kvalitě vhodné pro analýzu PCR produktů, 1 ml ve šroubovacích umělohmotných zkumavkách.

Karbofuchsin

Složení: bazický fuchsin 1 g, 96% ethanol 10 ml, 5% vodní roztok fenolu 100 ml
Příprava: smícháním reagensů vzniká suspenze, která se filtruje a následně ředí destilovanou vodou v poměru 1:10

Krystalová violet'

Složení: Krystalová violet' 5 g 96% ethanol 220 ml 1% oxalacetát amonný

Příprava: smícháním reagensů vzniká suspenze, která se posléze filtruje

Kyselina boritá (Penta Chemicals)

Obsah: min. 99,5 %, pH (nasycený roztok, 25 °C) 3,4–4,4

Lugolův roztok

Složení: jód 1 g, jodid draselný 2 g, destilovaná voda 300 ml

Příprava: jód a jodid draselný se rozpustí v destilované vodě

PCR Ultra H₂O (Top-Bio)

Složení: speciálně upravená ultračistá voda bez DNáz a RNáz bez využití diethylpyrokarbonátu (DEPC). V přípravku PCR Ultra H₂O se RNázy odstraní použitím dvojité afinitní chromatografie na speciálním nosiči.

Peroxid vodíku pro katalázu (Penta Chemicals)

Obsah: 29,0–32,0 %, hustota (20 °C) 1,11 g/cm³, čirá bezbarvá kapalina

Primery: všechny primery měly po přidání příslušného objemu PCR Ultra H₂O koncentraci 0,1 mM

Tabulka 10 Seznam použitých primerů

Název	Sekvence	Literatura	Výrobce
C-GOS-f	5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Hayashi et al., 2001	Generi Biotech, Česká republika
C-OCH-r	5'- GATGCCGTCCTATATACTATGGGG-3'		
C-SPU-r	5'- GATGCCGTCCTATATAACCATTAGG-3'		
C-GIN-r	5'- GGACGCATGCCCATCTTTCACCACCGC-3'		
C-GI2F	5'-GAGACAGGGACCAGACTCCT Plus 3'	NCBI BLAST	
C-GI2R	5'-TCTTGCTAGAGTCCCCACCTT Minus 3'	NCBI BLAST	

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (SERVA)

Obsah: min. 99 %, pH (5 % ve vodě) 10,0–11,5

Tris-Borát-EDTA pufr (TBE) 10x

Složení: Tris 108 g, kyselina boritá 55 g, EDTA 5,84 g, destilovaná voda 1 l

Příprava: v destilované vodě se rozpustí Tris, kyselina boritá a EDTA, tento roztok se následně mísí až do úplného rozpuštění

Tris-Borát-EDTA pufr 1x

Příprava: tento roztok se připravuje z koncentrovaného Tris-Borát-EDTA pufr (TBE) 10x tím, že se do odměrného válce odebere 100 ml a doplní 900 ml destilované vody, aby výsledný objem činil 1 litr.

2.6 Referenční kmeny rodu *Capnocytophaga*

V této diplomové práci byly využity referenční kmeny bakterií rodu *Capnocytophaga*, a to sice *Capnocytophaga ochracea* (CCM 3711), *Capnocytophaga sputigena* (CCM 3712) a *Capnocytophaga gingivalis* (CCM 3710). Tyto druhy se využívaly jako pozitivní kontroly při molekulárně-biologických testech a zároveň jako vzor při pokusech o izolaci a kultivaci orálních bakterií rodu *Capnocytophaga* ze zubního plaku člověka.

Tabulka 11 Využité referenční kmeny

Označení referenčního kmene	Původ
CCM 3710 <i>Capnocytophaga gingivalis</i>	CCM MUNI
CCM 3711 <i>Capnocytophaga ochracea</i>	CCM MUNI
CCM 3712 <i>Capnocytophaga sputigena</i>	CCM MUNI

Poznámka: MUNI – Masarykova univerzita

2.7 Experimentální část

Původní práce, ze které vychází experimentální část diplomové práce, pochází z roku 2001 od Fumiko Hayashi et al., kde se pomocí PCR reakce a následných molekulárně-biologických metod, snažili detekovat druhy *C. gingivalis*, *C. ochracea* a *C. sputigena* v zubním plaku dětí ve věku od 2 do 12 let. V této diplomové práci šlo o průkaz těchto vybraných druhů rodu *Capnocytophaga* u různých věkových kategorií na základě určitých orálních symptomů. Součástí diplomové práce byl i experiment pokoušející se o současné stanovení všech zmíněných druhů současně, vzorem pro tento pokus byla studie od Idate et al. z roku 2020.

2.7.1 Oživení referenčních kmenů

Referenční kmeny bakterií rodu *Capnocytophaga*, konkrétně CCM 3710, CCM 3711 a CCM 3712, byly rozpečeteny ze skleněných ampulí, kde se nacházely ve formě lyofilizátu. Po rozbíjení ampulí se přenesl 1 ml BHI tekutého bujónu k lyofilizátu a důkladně promíchal. Poté se veškerý objem přenesl z ampule do sterilní skleněné zkumavky opatřené zátkou, kde byl již napipetován 1 ml BHI tekutého bujónu. Opět se obsah zkumavky pečlivě promísil a ihned

zazátkoval. Následně se na modifikovaný KA (KA-G) přeneslo 100 µl této suspenze a inokulovalo technikou čárkování. Po rozočkování se Petriho misky uložily do anaerobních pytlíků (sáčků) s vyvíječi plynu pro simulaci anaerobního prostředí a vložily do inkubátoru (37 °C, 48 h).

Po uložení misek do inkubátoru se zbývající bakteriální suspenze rozdělila do zkumavek Eppendorf a do kryozkumavek. Část se napipetovala do 1,5 ml zkumavek typu Eppendorf a uložila do -20 °C a zbývající část se napipetovala do 1,5 ml kryozkumavek a uložila do -80 °C. Pro zamražení do -80 °C se k 1 ml bakteriální suspenze přidávalo ještě 500 µl glycerolu, coby kryoprotektivního média.

2.7.2 Odběr vzorku, kultivace, izolace DNA

Odběr vzorku se prováděl odběrovou soupravou s Amies médiem pomocí výtěrového tampónu. Dobrovolníci odebrali ráno ihned po probuzení vzorky zubního plaku z dásňových sulků třenových zubů a stoliček výtěrovým tampónem. Následně vložili tampón do transportního média Amies a odevzdali. Odběrové zkumavky byly v laboratoři označeny a naočkovány na dva typy pūd: nemodifikovaný krevní agar (KA) s 5 % beraní krve a modifikovaný krevní agar (KA-G) s 10 % beraní krve a koncentrací gentamicinu 20 µg/ml. Po naočkování na plotny Petriho misek se tampón vložil do 10 ml plastové zkumavky s 2 ml BHI tekutého bujónu pro pomnožení orální flóry. Zkumavky se následně uložily do inkubátoru na 24 h. Po 24 h inkubace se pipetou odebral 1 ml bujónu s pomnoženou mikroflórou a přenesl do 1,5 ml sterilní zkumavky Eppendorf. Po přenesení příslušného objemu se zkumavky typu Eppendorf označily a vložily do termobloku (95 °C, 10 min), aby došlo k lýze bakteriálních buněk a uvolnění DNA bakterií. Po této lýze se 1,5 ml zkumavky Eppendorf uložily do mrazicího zařízení na -20 °C.

Po naočkování ploten krevního agaru se KA uložil do inkubátoru na 48 h, při teplotě 37 °C. KA-G se po inokulaci uložil do sáčků s vyvíječi plynu pro vytvoření anaerobního prostředí a vložil do inkubátoru rovněž na 48 h při teplotě 37 °C. Po 48 h následoval odečet nárůstu na jednotlivých plotnách Petriho misek a přeočkování na nové misky se stejnými podmínkami inkubace.

Každý dobrovolník dostal kromě sterilní odběrové soupravy navíc anonymní dotazník vztahující se k danému vzorku označenému číslem, dotazník viz příloha. Výsledky experimentální části se poté vztahují k odpovědím z dotazníku.

2.7.3 Metoda PCR

Po sterilizaci pracovních prostor laminárního boxu pomocí UV záření a rozmražení reagensů při laboratorní teplotě se připravila reakční směs, jejíž příprava pro rod *Capnocytophaga* byla již optimalizována v diplomové práci Martiny Lejskové z roku 2023 pro *Capnocytophaga canimorsus*. Na základě dosažených výsledků a očekávání, které tento program splňoval, bylo rozhodnuto aplikovat jej i na vzorky testující lidské orální *Capnocytophaga* (viz tabulka č. 10).

Tabulka 12 Obecné schéma obsah a objem reagensů pro 1 vzorek (objem 25 μ l)

Reagencie	Objem (μ l)
PCR voda	9,25
Primer r	0,125
Primer f	0,125
Master mix	12,5
+ 3 μ l buněčného lyzátu	

Dle množství vzorků se vždy objem těchto reagensů vynásobil počtem vzorků. Po přenesení veškerého potřebného množství vzorků a připravení směsi pro PCR reakci se zvolil program na termocykleru převzatý z práce Suzuki et al. (2010). Program zahrnoval: počáteční denaturaci, denaturaci, nasedání primerů (annealing), prodlužování a závěrečné prodlužování (elongace), konkrétní hodnoty, viz tabulka č. 11. Doba trvání PCR reakce byla 2 hodiny.

Tabulka 13 Podmínky programu PCR reakce dle Suzuki et al., 2010

Fáze	Podmínky	Opakování
Počáteční denaturace	95 °C, 5 min	
Denaturace	95 °C, 30 s	35krát
Nasedání primerů (annealing)	58 °C, 1 min	
Prodlužování	72 °C, 20 s	
Závěrečné prodlužování (elongace)	72 °C, 7 min	

2.7.4 Gelová elektroforéza

Po proběhnutí PCR reakce se přistoupilo k provedení gelové elektroforézy, při které se oddělily produkty reakce dle molekulové hmotnosti a pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Nejprve se připravil 1,5% agarózový gel navážením 1,2 g agarózy a zalitím 80 ml TBE pufru. Tato suspenze se posléze umístila do mikrovlnné trouby na 2 min, 500 W. Dokonale roztavená původní suspenze se poté zchladila proudem studené vody přibližně na 60 °C. Do ochlazeného gelu se napipetovaly 4 µl interkalačního barviva ethidium bromid pro vizualizaci výsledku. Po důkladném promíchání se gel nalil do připravené vaničky v elektroforetické vaně. Po nalití se za pomoci špičky odstranily případné bublinky, které by mohly narušovat průběh elektroforézy, vložil se hřebínek pro vytvoření jamek a gel se nechal ztuhnout po dobu cca 20 min. Za 20 min se hřebínek vytáhl a přilil se pufr, ve kterém byl gel již připravován tak, aby jeho množství dosahovalo po rysku na elektroforetické vaně. Po přenesení dostatečného množství pufru do vany se poté napipetovaly vybrané vzorky z 0,2 ml Eppendorf zkumavek s PCR produktem. Pipetáž byla vždy 10 µl vzorku a 5 µl DNA markeru, nejčastěji se jednalo o marker 100–500 bp. Po ukončení pipetování se elektroforetická vana překryla víkem s vodivými kabely, které se zapojily do zdroje napětí a nastavil se vhodný program: 100 V, 400 mA, 150 W, 60 min. Po uplynutí 60 min se elektroforéza automaticky ukončila a gel z vany se přenesl do transiluminátoru pro vizualizaci výsledku pomocí UV záření a příslušného softwaru IC Measure.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

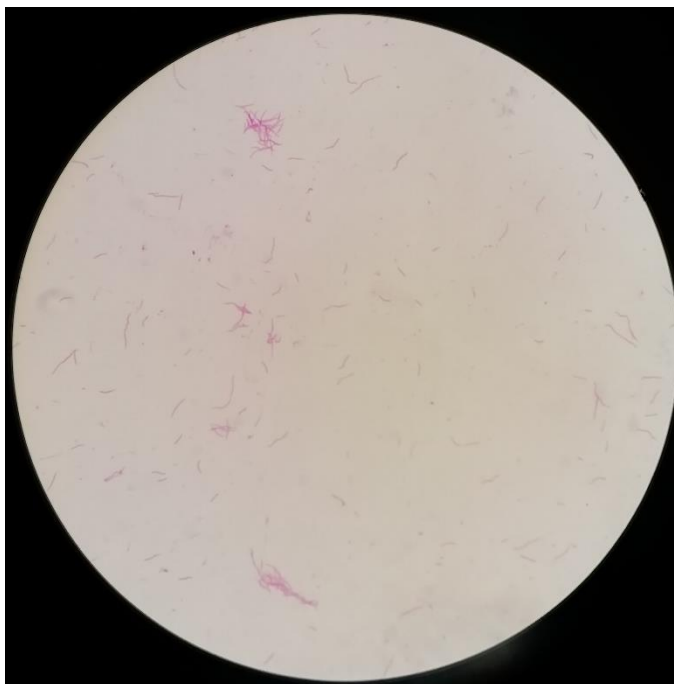
3.1 Izolace čisté kultury a kultivace *Capnocytophaga* spp.

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat odebrané vzorky zubního plaku od dobrovolníků kultivačními a molekulárně-biologickými metodami a v návaznosti na získané výsledky a odpovědi z dotazníku vyhodnotit a porovnat získané údaje s dalšími publikacemi. Kultivace jednotlivých vzorků probíhaly na KA-G s 10 % beraní krve a koncentrací gentamicinu 20 µg/ml za anaerobních podmínek po dobu 48 h při teplotě 37 °C. Petriho misky bez obsahu gentamicinu byly velmi přerostlé různorodou orální mikroflórou, z tohoto důvodu jsem od dalšího očkování na nemodifikovaný KA upustila a očkovala již pouze na KA-G. Nicméně i přes veškerou snahu a dodržování aseptických postupů, se izolace čisté kultury nezdařila. Vykultivovat se podařilo pouze referenční kmeny, které byly využity jako vzor pro rozpoznání bakterií rodu *Capnocytophaga* na KA-G ze směsné kultury a posléze také jako vzor pro pozorování preparátů v mikroskopu pomocí techniky barvení dle Grama.

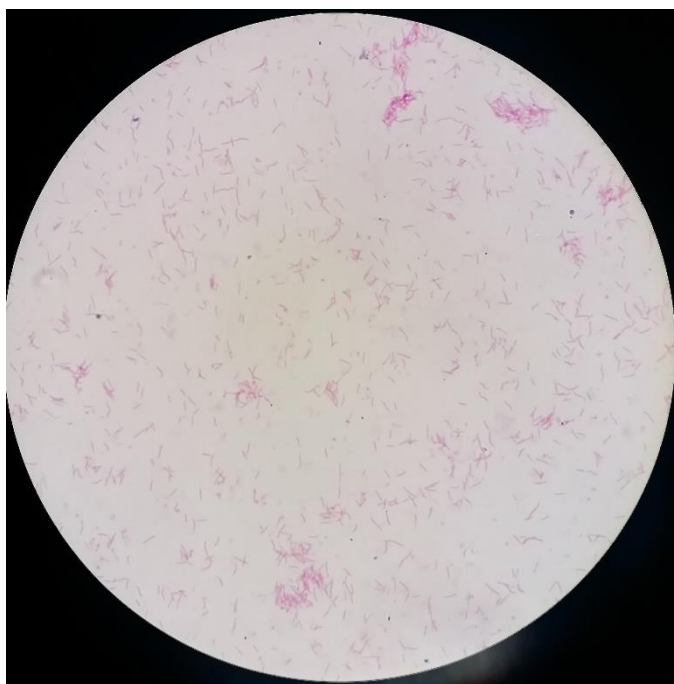


Obrázek 11 Fotografie naočkovaných referenčních kmenů na KA-G, nahore *C. sputigena*, vlevo *C. ochracea*, vpravo *C. gingivalis*, z archivu autora

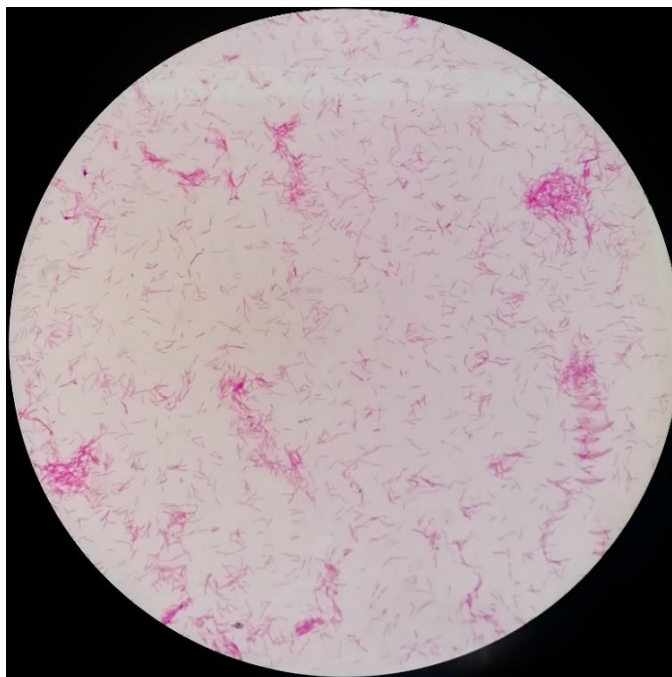
Podmínky kultivace: anaerobní prostředí, 48 h, 37 °C



Obrázek 12 Fotografie ref. kmenu C. gingivalis, barveno dle Grama, celkové zvětšení 1000x, snímek z archivu autora



Obrázek 12 Fotografie ref. kmenu C. ochracea, barveno dle Grama, celkové zvětšení 1000x, snímek z archivu autora



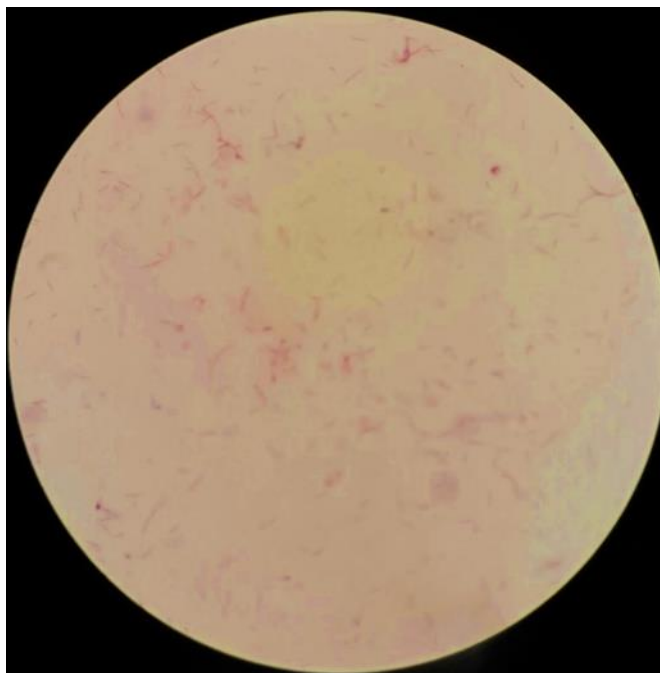
Obrázek 13 Fotografie ref. kmenu *C. sputigena*, barveno dle Grama, celkové zvětšení 1000x, snímek z archivu autora

Vzhled kolonií referenčních kmenů na KA-G: profil plochý, barva kolonií šedobílá s perleťovým leskem (v případě druhu *C. gingivalis*), tvar kolonií byl ve většině případů okrouhlý, avšak u *C. ochracea* se vyskytovaly kolonie se zvlněnými až vláknitými okraji, nárůst těchto druhů nevykazoval žádné známky hemolýzy. Průkaz na katalázu vyšel negativní.

Martina Lejsková ve své diplomové práci z roku 2023 izolovala čistou kulturu *C. canimorsus* z výtěru dutiny ústní psů. Izolace a kultivace těchto vzorků probíhala na KA-G se 40 µg/ml gentamicinu 4–5 dní při 37 °C za podmínek 5 % CO₂. Po provedení biochemických testů na přítomnost cytochromoxidázy a katalázy a Gramova barvení byly tyto kolonie identifikovány jako *C. canimorsus*. V mém případě jsem se snažila použít stejný princip přípravy kultivační půdy s výjimkou nižší koncentrace gentamicinu a změnou kultivačních podmínek na 48–72 h při teplotě 37 °C v anaerobním prostředí. Avšak na rozdíl od výše zmíněné práce, se izolace čisté kultury humánních orálních druhů *Capnocytophaga* nezdařila. Nicméně patrný výskyt bakterie *Capnocytophaga* spp. byl u vzorku č. 51 (VZ č. 51) se směsnou kulturou. Pozdější molekulárně-biologické metody potvrdily přítomnost druhů *C. sputigena* a *C. gingivalis*.



Obrázek 14 KA-G se VZ č. 51 (vpravo) a 55 (vlevo), u VZ č. 51 patrný nárůst kolonií s vláknitými okraji, snímek z archivu autora



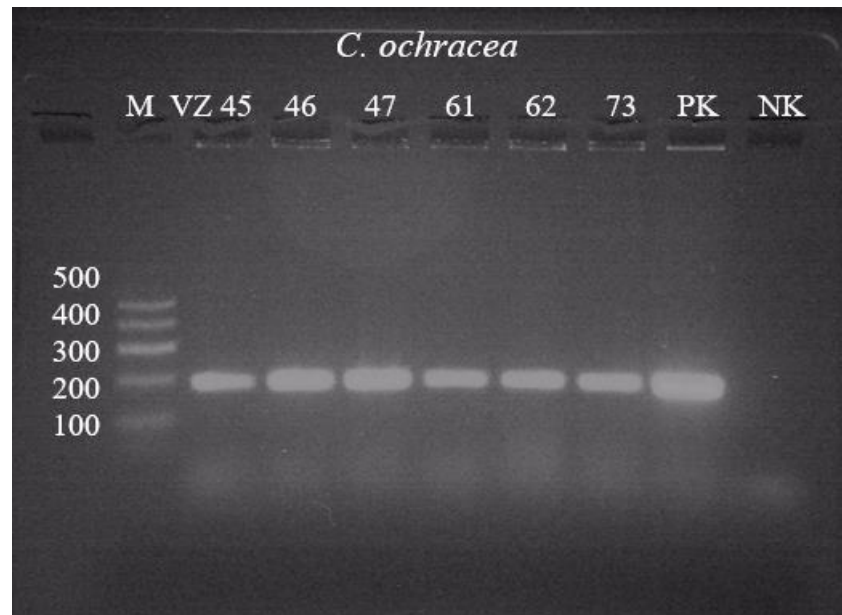
Obrázek 15 Mikroskopický průkaz přítomnosti Capnocytophaga pomocí Gramova barvení, jedná se o výskyt G- tyčinek, celkové zvětšení 1000x, snímek z archivu autora

3.2 Identifikace vybraných druhů *Capnocytophaga* spp.

Identifikace jednotlivých druhů *Capnocytophaga* probíhala molekulárně-biologickými metodami. Všechny 76 vzorků odebraného zubního plaku jsem analyzovala pomocí PCR reakce s příslušnými druhově specifickými primery a následně detekovala pomocí plošné gelové elektroforézy. Primery, které se využily pro detekci vybraných druhů rodu *Capnocytophaga*, byly stejné jako v publikaci od Hayashi et al. z roku 2001. Sekvence dopředného primeru pro druh *C. ochracea* byla tedy 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' a reverzního primeru 5'-GATGCCGTCCTATATACTATGGGG-3'. Pro druh *C. sputigena* byl využit dopředný primer 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' a reverzní primer 5'-GATGCCGTCCTATATAACCATTAGG-3'. Velikosti produktů PCR reakce pro *C. ochracea* a *C. sputigena* odpovídaly 185 bp. V případě *C. gingivalis* však došlo k výrazným změnám, neboť původní sekvence primerů užitých v článku Hayashi et al. (2001) – dopředný primer 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' a reverzní primer 5'-GGACGCATGCCCATCTTTCACCACCGC-3' nebyly specifické pro daný druh, velikost produktů odpovídala 227 bp. V důsledku jejich nespecifičnosti došlo ke změně a byly navrženy nové specifické sekvence pomocí programu Primer-BLAST od National Library of Medicine. Primery byly následující – dopředný primer 5'-GAGACAGGGACCAGACTCCT Plus 3' a reverzní primer 5'-TCTTGCTAGAGTCCCCACCTT Minus 3', předpokládaná velikost produktů byla 822 bp. Ve všech testovaných vzorcích byl prokázán druh *C. gingivalis* (100 %). To se shoduje s výsledky publikovanými ve studii Hayashi et al. (2001) kteří prokázali *C. gingivalis* ve všech vzorcích z dutiny ústní zdravých dětí. V případě druhů *C. ochracea* a *C. sputigena* byly výsledky již odlišné. Pozitivita druhu *C. ochracea* v zubním plaku dobrovolníků vyšla v 45 případech z celkového počtu 76 vzorků, tj. v 59,2 %. V případě druhu *C. sputigena* byl pozitivní průkaz u 57 vzorků z celkového počtu 76 otestovaných, z hlediska procentuálního zastoupení se jedná o 75,0 %. Z výsledku je patrné, že výskyt druhu *C. sputigena* byl vyšší než *C. ochracea*.

Tabulka 14 Výskyt vybraných druhů rodu *Capnocytophaga*

Vzorky 1–76	<i>C. ochracea</i>	<i>C. sputigena</i>	<i>C. gingivalis</i>
Absolutní počet pozitivních vzorků	45	57	76
Procentuální zastoupení pozitivních vzorků	59,2 %	75,0 %	100,0 %



Obrázek 17 Snímek z gelové elektroforézy na průkaz přítomnosti *C. ochracea*, z archivu autora, upraveno

M – DNA marker o velikosti 100–500 bp, *VZ 45–73* – čísla testovaných vzorků, *PK* – pozitivní kontrola, zde byl využit ref. kmen *C. ochracea*, *NK* – negativní kontrola

Při porovnání výsledků analýzy z diplomové práce s výsledky studie od Hayashi et al. (2001) je patrné, že výskyt *C. sputigena* vůči *C. ochracea* je procentuálně vyšší než v případě dětí z Japonska. *C. sputigena* je v této diplomové práci zastoupena ze 75,0 % a *C. ochracea* 59,2 %. V případě dětí z Japonska vychází procentuální zastoupení *C. ochracea* na 87,7 % a *C. sputigena* 37,7 %. S ohledem na *C. gingivalis* studie uvádí, že se vyskytovala celkem v 86,1 % případů, avšak v rámci této diplomové práce, vycházela četnost tohoto druhu na celých 100,0 %. Vzhledem k tomu, že se druh *C. gingivalis* nacházel ve všech vyšetřených vzorcích, nestal se předmětem statistického zhodnocení výskytu jednotlivých druhů v závislosti na věku, pohlaví a příznacích parodontopatií v dutině ústní. Shigeishi et al. (2024) ve své studii zabývající se prevalencí a asociací orálních druhů *Capnocytophaga* s kumulací zubního plaku a souvislostí s parodontálními záněty u lidí středního a vyššího věku uvedli, že celkový výskyt *C. ochracea* vyšel v 67,6 % případů a *C. sputigena* v 83,1 % případů. V porovnání s výsledky diplomové práce je zřejmé, že se v této studii stejně jako v mé diplomové práci prokázala vyšší prevalence *C. sputigena* než *C. ochracea*.

Idate et al. (2018) ve své studii uvádí, že výskyt *C. gingivalis*, *C. ochracea* a *C. granulosa* byl vyšší u jedinců se zdravým parodontem, než u jedinců s gingivitidou a parodontitidou. V případě jedinců se zdravým parodontem se výše zmíněné bakterie vyskytovaly ve 30,0 %

případů, zatímco u pacientů s diagnózou gingivitidy se vyskytovaly ve 14,0 % a u pacientů s parodontitidou ve 12,0 %. Druh *C. gingivalis* se vyskytoval v 5,3 % případů, *C. ochracea* v 6,7 % a *C. granulosa* v 4,7 %. Z těchto údajů je patrné, že výskyt druhu *C. ochracea* byl v této studii nejvyšší, zatímco v porovnání s výsledky diplomové práce dosáhla nejvyššího procentuálního zastoupení *C. sputigena*, a to 75,0 % na rozdíl od *C. ochracea*, která se vyskytovala v 59,2 %. Ve druhé studii od Idate et al. (2020) vyšlo, že procentuální zastoupení *C. ochracea* bylo nižší než v případě mých výsledků, tj. v diplomové práci vyšel výskyt *C. ochracea* 59,2 % a ve studii od Idate et al. (2020) činil výskyt *C. ochracea* 36,3 %. Přestože v tomto případě byla skupina zkoumaných pacientů mnohem vyšší, celkem se jednalo o 300 jedinců, tak v přepočtu na počet otestovaných vzorků v diplomové práci (76), vychází toto procentuální zastoupení ve studii Idate et al. (2020) nižší.

V protokolu od Pushpa et al. (2016) vyšel kultivačně prokázaný výskyt bakterií rodu *Capnocytophaga* vyšší u pacientů s diagnózou parodontopatií než u jedinců se zdravým parodontem. V případě gingivitidy se jednalo o pozitivitu v 52,5 % a u pacientů s diagnostikovanou parodontitidou v 30,0 %, zatímco v případě zdravého parodontu se jednalo o výskyt ve 27,5 % případů.

3.3 Výsledky studie

Na základě odpovědí z dotazníkového šetření a výsledků analýzy jednotlivých vzorků bylo vytvořeno statistické zhodnocení výskytu vybraných druhů rodu *Capnocytophaga* v zubním plaku dobrovolníků. Výsledky analýz vzorků byly vztaženy k věku a pohlaví jednotlivých respondentů a jejich klinickým příznakům parodontopatií, v závislosti na získaných datech bylo provedeno statistické vyhodnocení. Součástí studie byly také otázky zaměřené na orální hygienu každého dotazovaného a jejich prostředky pro udržení čistoty dutiny ústní, zda jsou aktivními kuřáky či nikoliv, pravidelností návštěvy dentálních hygieny a v neposlední řadě k jejich povědomí o parodontálních onemocněních a zda s nimi mají či měli dotazovaní osobní zkušenost. Odpovědi na tyto otázky byly shrnuty formou absolutní a relativní četnosti do tabulek.

Počet otestovaných vzorků se shodoval s počtem dotazníků, tj. 76. Odpovědi pro statistické zhodnocení byly shromažďovány pomocí programu Microsoft Forms. Dotazník obsahoval celkem 17 otázek, na které existovala pouze jedna správná odpověď, avšak u 2 otázek bylo možné vybrat jako odpověď možnost Jiné, kde dotazovaný vypsál svoji

preferovanou odpověď. Výsledky statistického zhodnocení byly následně zpracovány pomocí programu MATLAB a tvorba tabulek probíhala pomocí programu Microsoft Excel 365.

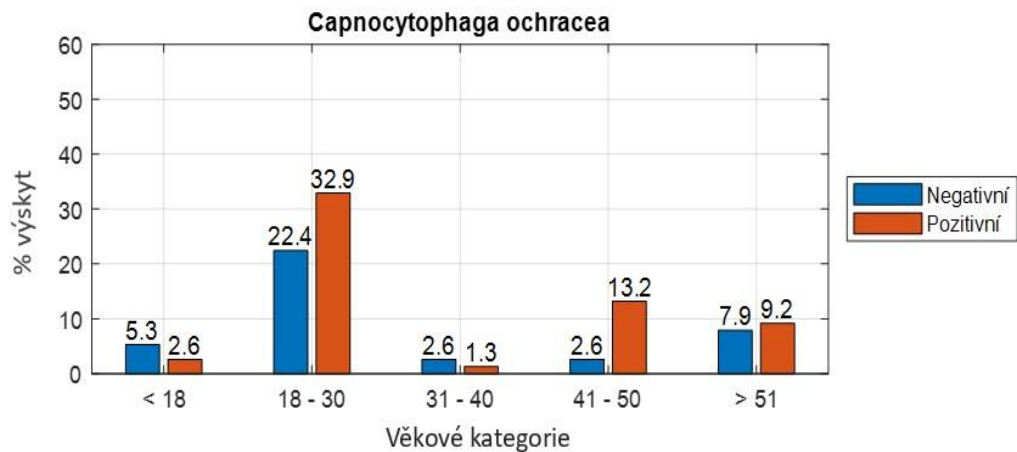
3.3.1 Otázka č. 1 – Do jaké věkové kategorie se řadíte?

Otázka č. 1 se zaměřovala na zařazení dotazovaného respondenta do určité věkové skupiny. Na výběr měli dotazovaní kategorie – méně než 18, 18–30, 31–40, 41–50 a 51 a více. Z hlediska relativní četnosti měly jednotlivé skupiny zastoupení – 7,9 %, 55,3 %, 3,9 %, 15,8 % a 17,1 %. K této otázce se rovněž vztahovalo statistické zhodnocení závislosti pozitivního výskytu druhů *C. ochracea* a *C. sputigena* na jednotlivých věkových kategoriích. Čísla u jednotlivých sloupců grafů vyjadřují relativní četnost výskytu (%) pro každou z kategorií, které respektuje nanejvýš velké skupiny respondentů (graf 1). Relativní četnost pozitivního výskytu *C. ochracea* je vždy vztažena k celkovému počtu respondentů.

Ve 2,6 % případech pozitivního výskytu *C. ochracea* z celku byli respondenti mladší 18 let, 32,9 % zaujímali jedinci z věkové kategorie 18–30 let, 1,3 % případů zaujímala věková skupina 31–40 let, 13,2 % případů odpovídalo věkové kategorii 41–50 let a 9,2 % případů pozitivního výskytu *C. ochracea* z celku odpovídalo kategorii 51 a více let.

Tabulka 15 Věkové kategorie – výsledky pro *Capnocytophaga ochracea*

Věková kategorie	Absolutní četnost odpovědí	Relativní četnost odpovědí v %	Relativní četnost pozitivního výskytu <i>C. ochracea</i> v % z celku	Relativní četnost negativního výskytu <i>C. ochracea</i> v % z celku
Méně než 18	6	7,9	2,6	5,3
18–30	42	55,3	32,9	22,4
31–40	3	3,9	1,3	2,6
41–50	12	15,8	13,2	2,6
51 a více	13	17,1	9,2	7,9
Celkem	76	100,0	100,0	

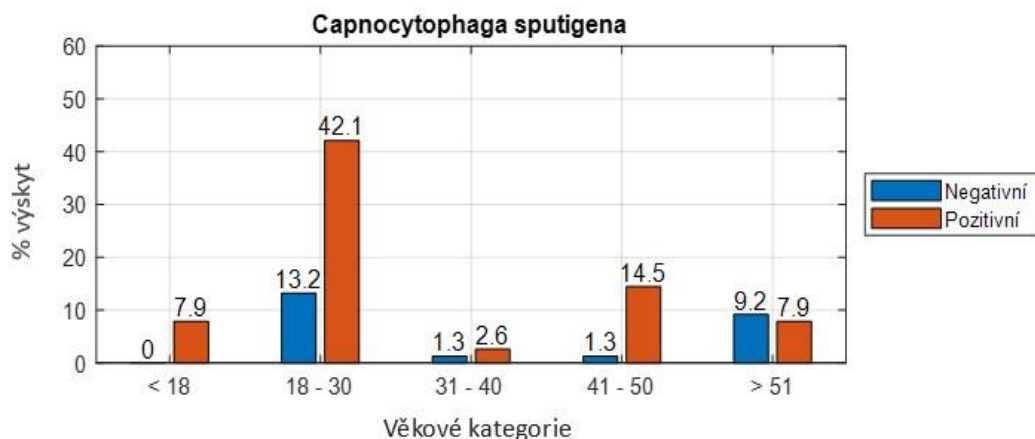


Graf 1 Graf závislosti výskytu *Capnocytophaga ochracea* na věkových kategoriích

V případě *C. sputigena* vyšla závislost pozitivního výskytu z celku na jednotlivých věkových kategoriích takto – 7,9 % pro méně než 18, 42,1 % pro 18–30 let, 2,6 % pro 31–40 let, 14,5 % pro 41–50 let a 7,9 % pro kategorii 51 a více let.

Tabulka 16 Věkové kategorie – výsledky pro *Capnocytophaga sputigena*

Věková kategorie	Absolutní četnost odpovědí	Relativní četnost odpovědí v %	Relativní četnost pozitivního výskytu <i>C. sputigena</i> v % z celku	Relativní četnost negativního výskytu <i>C. sputigena</i> v % z celku
Méně než 18	6	7,9	7,9	0,0
18–30	42	55,3	42,1	13,2
31–40	3	3,9	2,6	1,3
41–50	12	15,8	14,5	1,3
51 a více	13	17,1	7,9	9,2
Celkem	76	100,0	100,0	



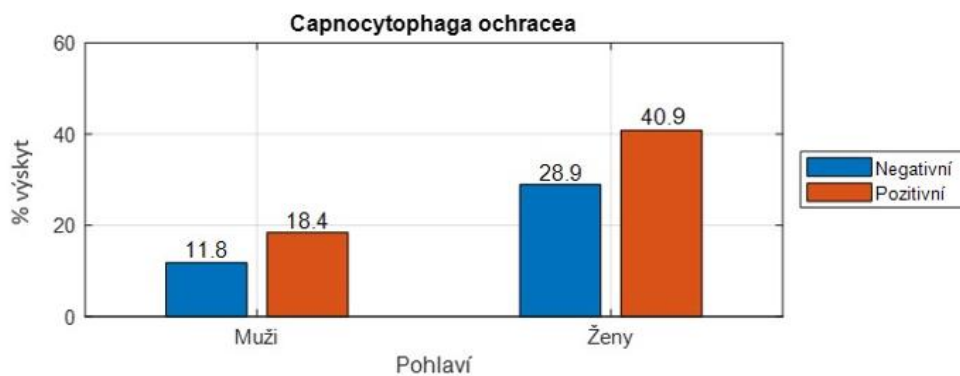
Graf 2 Graf závislosti výskytu *Capnocytophaga sputigena* na věkových kategoriích

3.3.2 Otázka č. 2 – Jaké je Vaše pohlaví?

Hlavní myšlenkou otázky č. 2 bylo rozdělení jednotlivých respondentů dle jejich pohlaví na muže a ženy. Na základě této otázky bylo možno statisticky zhodnotit, zda je výskyt vybraných druhů rodu *Capnocytophaga* ovlivněn pohlavím daného jedince či nikoliv. Dle získaných odpovědí se průzkumu účastnilo 23 mužů a 53 žen. K této otázce se taktéž vztahovalo statistické zhodnocení závislosti pozitivního výskytu druhů *C. ochracea* a *C. sputigena* na pohlaví. Čísla u jednotlivých sloupců grafů vyjadřují relativní četnost (%) výskytu pro obě pohlaví. Závislost pozitivního výskytu *C. ochracea* z celku na pohlaví vycházela – 18,4 % pro muže a 40,9 % pro ženy.

Tabulka 17 Pohlaví – výsledky pro *Capnocytophaga ochracea*

Pohlaví	Absolutní četnost odpovědí	Relativní četnost odpovědí v %	Relativní četnost pozitivního výskytu <i>C. ochracea</i> v % z celku	Relativní četnost negativního výskytu <i>C. ochracea</i> v % z celku
Muž	23	30,3	18,4	11,8
Žena	53	69,7	40,9	28,9
Celkem	76	100,00	100,00	

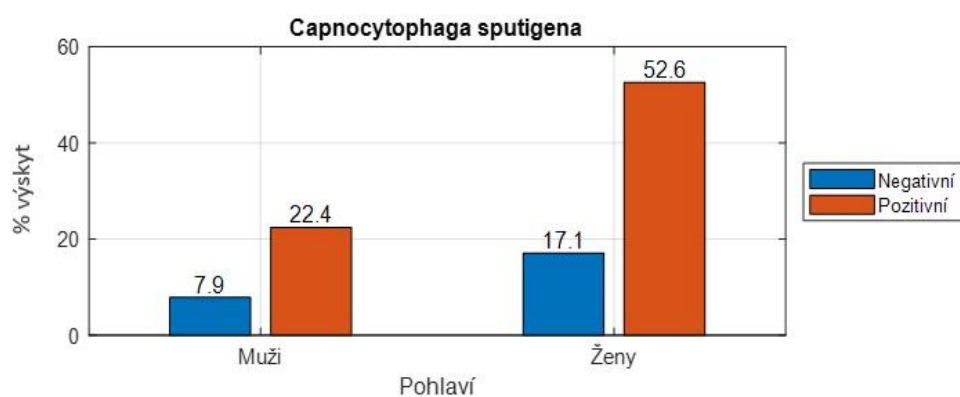


Graf 3 Graf závislosti výskytu *Capnocytophaga ochracea* na pohlaví

V případě *C. sputigena* vycházela závislost pozitivního výskytu z celku na pohlaví – 22,4 % pro muže a 52,6 % pro ženy.

Tabulka 18 Pohlaví – výsledky pro *Capnocytophaga sputigena*

Pohlaví	Absolutní četnost odpovědí	Relativní četnost odpovědí v %	Relativní četnost pozitivního výskytu <i>C. sputigena</i> v % z celku	Relativní četnost negativního výskytu <i>C. sputigena</i> v % z celku
Muž	23	30,3	22,4	7,9
Žena	53	69,7	52,6	17,1
Celkem	76	100,0	100,00	



Graf 4 Graf závislosti výskytu *Capnocytophaga sputigena* na pohlaví

3.3.3 Otázka č. 3 – Jak často provádíte hygienu dutiny ústní?

V otázce č. 3 odpovídali jednotliví respondenti na to, s jakou četností provádějí orální hygienu. Majoritní většina označila možnost 2x denně každý den s četností 92,1 %. Přibližně 8 % poté odpovědělo, že si čistí dutinu ústní pouze 1x denně. Další možnosti jako 3x denně každý den, po každém jídle a neprovádím, ne zvolil nikdo.

Tabulka 19 Pravidelnost orální hygieny

Jak často provádíte hygienu dutiny ústní?	Absolutní četnost	Relativní četnost v %
3x denně každý den	0	0,0
2x denně každý den	70	92,1
1x denně	6	7,9
Po každém jídle	0	0,0
Neprovádím	0	0,0
Celkem	76	100,0

3.3.4 Otázka č. 4 – Jaké pomůcky využíváte pro udržení čistoty dutiny ústní?

Je možno vícero odpovědí. Pokud zvolíte možnost Jiné, uveďte:

Otázka č. 4 se zabývala tím, jaké pomůcky využívají dotazovaní pro udržování zdraví jejich dutiny ústní. Více než 31,6 % respondentů odpovědělo, že pro hygienu dutiny ústní využívají pouze zubní kartáček. 30,3 % uvedlo, že kromě klasického zubního kartáčku používají také mezizubní kartáček/kartáčky, 22,4 % označilo, že kromě klasického kartáčku, mezizubních kartáčku/kartáčeků využívají navíc ještě jednosvazkový kartáček. Celkem 5,3 % dotazovaných využívá pro udržení čistoty dutiny ústní ještě kromě výše zmíněných také dentální nit. 1,3 % uvedlo, že kromě běžných prostředků pro udržení správné hygieny dutiny ústní, užívá navíc i ústní sprchu. 9,2 % dotazovaných zvolilo možnosti Jiné, kde vypsali své preferované odpovědi. Jednalo se např. pouze o užití zubního kartáčku a ústní vody, dále zubního kartáčku s občasným užitím mezizubního kartáčku či využití zubního kartáčku, mezizubního kartáčku/kartáčeků, jednosvazkového kartáčku a ústní sprchy.

Tabulka 20 Užívané prostředky pro udržení čistoty dutiny ústní

Jaké pomůcky využíváte pro udržení čistoty dutiny ústní?	Absolutní četnost	Relativní četnost v %
Pouze zubní kartáček	24	31,6
Zubní kartáček a mezizubní kartáček/kartáčky	23	30,3
Zubní kartáček, mezizubní kartáček/kartáčky a jednosvazkový kartáček	17	22,4
Zubní kartáček a mezizubní kartáček/kartáčky, dentální nit	4	5,3
Zubní kartáček a mezizubní kartáček/kartáčky, dentální nit, ústní sprchu	1	1,3
Pouze ústní sprchu	0	0,0
Jiné	7	9,2
Celkem	76	100,0

3.3.5 Otázka č. 5 – Zaměřujete se při orální hygieně také na důkladné vyčištění dásňových žlábků?

Otázka č. 5 zkoumala, zda se jednotliví respondenti zaměřují kromě čištění celých ploch zubů také na dásňové žlábků. Procentuální zastoupení odpovědí na tyto otázky vyšlo shodně, neboť 50,0 % odpovědělo kladně, tj. že se dotyční zaměřují při hygieně dutiny ústní i na důkladné čištění dásňových žlábků a 50,0 % označilo, že se důkladným očištěním dásňových žlábků příliš nezabývá.

Tabulka 21 Čištění dásňových žlábků

Zaměřujete se při orální hygieně také na důkladné vyčištění dásňových žlábků?	Absolutní četnost	Relativní četnost v %
Ano	38	50,0
Ne	38	50,0
Celkem	76	100,0

3.3.6 Otázka č. 6 – Řadíte se mezi aktivní kuřáky/kuřačky?

Otázka č. 6 se zaměřovala na to, zda dotazovaní jsou či nejsou aktivními kuřáky. Avšak tím, že tato otázka byla do dotazníků přidána později, nebyla zahrnuta do statistického zhodnocení závislosti kouření na výskytu daného druhu bakterie. Z 52 osob se za aktivního kuřáka/kuřačku označil pouze 1 dotazovaný, tj. z celkového počtu tvořil 1,9 %. 51 osob se za aktivního kuřáka/kuřačku nepovažuje, tj. 98,1 %.

Tabulka 22 Kuřák/kuřačka

Řadíte se mezi aktivní kuřáky/kuřačky?	Absolutní četnost	Relativní četnost v %
Ano	1	1,9
Ne	51	98,1
Celkem	52	100,0

3.3.7 Otázka č. 7 a 8 – Setkali jste se již někdy s pojmem gingivitida? Setkali jste se již někdy s pojmem parodontitida, resp. parodontóza?

Otázky č. 7 a 8 se zabývaly povědomím respondentů o neznámějších parodontopatiích a sice gingivitidě a parodontitidě. V případě gingivitidy odpovědělo kladně necelých 20 %, konkrétně 19,7 %. Zápornou odpověď zvolilo 80,3 %. Pojem parodontitida, resp. parodontóza, znalo již větší procento dotazovaných, přesněji 59,2 %. Naopak nesetkalo se s ním 40,8 %.

Tabulka 23 Pojem gingivitida

Setkali jste se již někdy s pojmem gingivitida?	Absolutní četnost	Relativní četnost v %
Ano	15	19,7
Ne	61	80,3
Celkem	76	100,0

Tabulka 24 Pojem parodontitida, resp. parodontóza

Setkali jste se již někdy s pojmem parodontitida, resp. parodontóza?	Absolutní četnost	Relativní četnost v %
Ano	45	59,2
Ne	31	40,8
Celkem	76	100,0

3.3.8 Otázka č. 9 – Věděli byste, jaký je mezi nimi rozdíl? *Pokud ano, uveďte*

Otázka č. 9 se zajímala o to, zda dotazovaní vědí, jaký je rozdíl mezi výše zmíněnými parodontopatiemi. Odpověď ANO zvolilo 13,2 %, odpověď NE zvolilo 51,3 % a 35,5 % odpovědělo, že si nejsou přesně jisti, jaký je mezi nimi rozdíl. Nicméně pouze 3 z nich dokázali uvést, jak přesně se od sebe tato dvě onemocnění liší, a jaký je mezi nimi významový rozdíl. Tj. gingivitida je zánětlivé onemocnění dásně, kdežto parodontitida je zánětlivé onemocnění závěsného aparátu zubu.

Tabulka 25 Rozdíl mezi gingivitidou a parodontitidou

Věděli byste, jaký je mezi nimi rozdíl? <i>Pokud ano, uveďte</i>	Absolutní četnost	Relativní četnost v %
Ano	10	13,2
Ne	39	51,3
Nejsem si úplně jistý/jistá, co přesně znamenají	27	35,5
Celkem	76	100,0

3.3.9 Otázka č. 10 – Měli jste někdy s těmito onemocněními problémy?

V případě, že jste v přechozích otázkách č. 7, 8 a 9 odpověděli NE, neodpovídáte

Tato otázka se zabývala tím, zda dotazovaní měli již někdy problémy s těmito druhy onemocnění. Podmínkou této otázky však bylo, že v případě že o nich nikdy neslyšeli, neodpovídali. 18,4 % z celkového počtu odpovědí 50, byla ta skupina, která označila, že se již někdy v minulosti s těmito onemocněními potýkala. 81,6 % dotazovaných uvedlo, že s těmito onemocněními dosud problémy neměli. Nicméně počty odpovědí zcela neodpovídají skutečnosti, neboť respondenti na tuto otázku reagovali, i když teoreticky neměli.

Tabulka 26 Problémy s onemocněními

Měli jste někdy s těmito onemocněními problémy? <i>V případě, že jste v předchozích otázkách č. 7, 8 a 9 odpověděli NE, neodpovídáte</i>	Absolutní četnost	Relativní četnost v %
Ano	9	18,4
Ne	40	81,6
Celkem	49	100,0

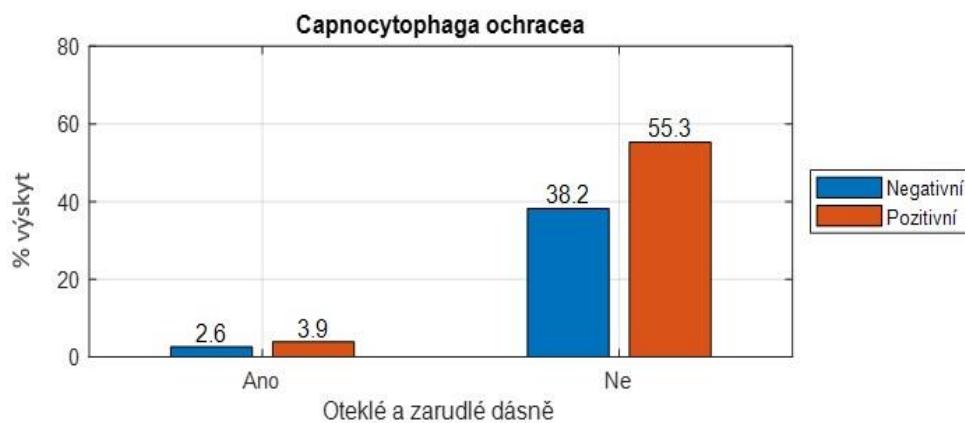
Otázky č. 11–15 se zaměřovaly na výskyt subjektivních obtíží u každého jednotlivého dotazovaného respondenta. Týkaly se zejména stavu jejich dásní, pocity suchosti v ústech, výskytem halitózy či zvýšenou citlivostí zubů. Tyto otázky týkající se příznaků parodontopatií jsou rovněž zahrnuty ve statistickém zhodnocení výskytu *C. ochracea* a *C. sputigena*.

3.3.10 Otázka č. 11 – Vyskytují se u Vás v současné době zduřelé a červeně zbarvené dásně

Ohledně výskytu zduřelých a červených dásní odpovědělo kladně v otázce č. 11 pouze 6,6 % a 93,4 % naopak označilo, že se u nich v současné době takového příznaky nevyskytují. Jak bylo již zmíněno výše součástí této otázky rovněž bylo statistické zhodnocení závislosti pozitivního výskytu druhů *C. ochracea* a *C. sputigena* na příznacích. Závislost pozitivního výskytu *C. ochracea* z celku na zduřelých a červených dásních vycházela 3,9 %. V případě, že nebyly přítomny tyto vnější projevy na dásních, vyšel pozitivní výskyt *C. ochracea* u 55,3 %.

Tabulka 27 Výskyt zduřelých a červených dásní – výsledky pro *Capnocytophaga ochracea*

Zduřelé a červené dásně	Absolutní četnost odpovědí	Relativní četnost odpovědí v %	Relativní četnost pozitivního výskytu <i>C. ochracea</i> v % z celku	Relativní četnost negativního výskytu <i>C. ochracea</i> v % z celku
Ano	5	6,6	3,9	2,6
Ne	71	93,4	55,3	38,2
Celkem	76	100,0	100,0	

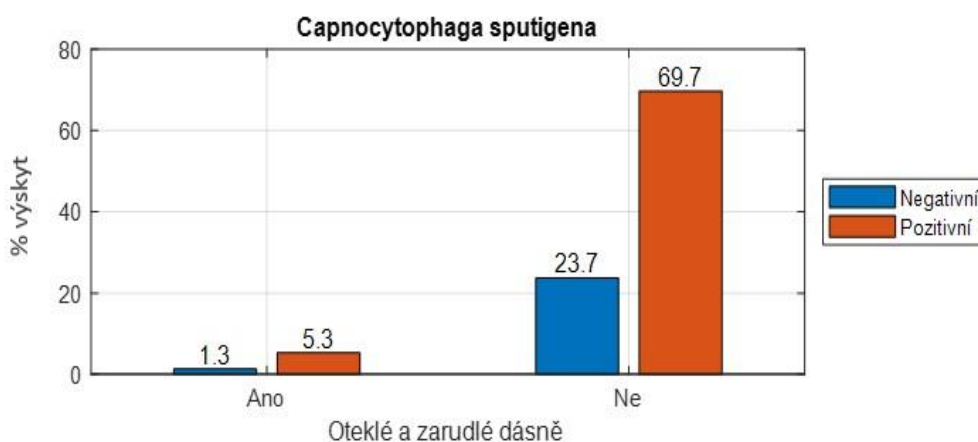


Graf 5 Graf závislosti výskytu *Capnocytophaga ochracea* na vizuálním stavu dásní

Závislost pozitivního výskytu *C. sputigena* z celku na zduřelých a červených dásních vycházela 5,3 %. V případě, že nebyly přítomny tyto vnější vizuální projevy na dásních, vyšel pozitivní výskyt *C. sputigena* u 69,7 %.

Tabulka 28 Výskyt zduřelých a červených dásní – výsledky pro *Capnocytophaga sputigena*

Zduřelé a červené dásně	Absolutní četnost odpovědí	Relativní četnost odpovědí v %	Relativní četnost pozitivního výskytu <i>C. sputigena</i> v % z celku	Relativní četnost negativního výskytu <i>C. sputigena</i> v % z celku
Ano	5	6,6	5,3	1,3
Ne	71	93,4	69,7	23,7
Celkem	76	100,0	100,0	



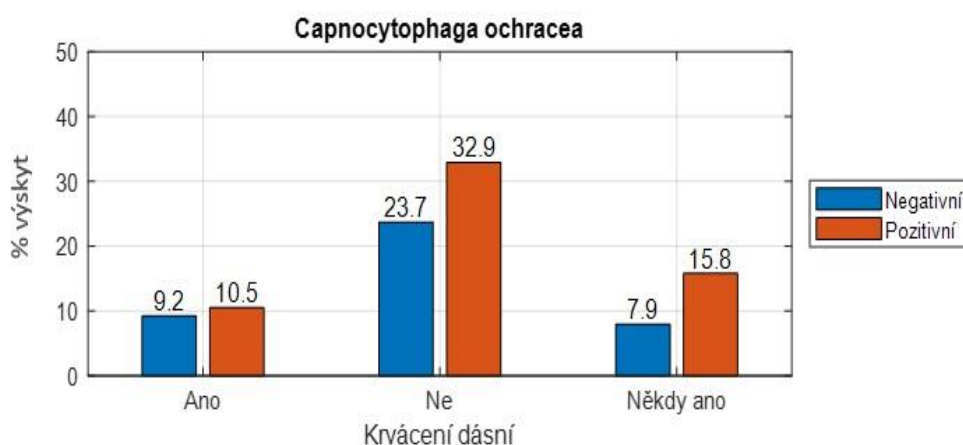
Graf 6 Graf závislosti výskytu *Capnocytophaga sputigena* na vizuálním stavu dásní

3.3.11 Otázka č. 12 – Dochází u Vás k častému krvácení dásní? Plivete při čištění zubů krev?

Otázka č. 12 zaměřená na krvácení dásní uvažovala výskyt častého krvácení, občasného krvácení a také nekrvácení dásní. Častým krvácením dásní trpí 18,4 % dotazovaných, občasné krvácení se vyskytuje u 25,0 % a 56,6 % žádným krvácením dásní v poslední době netrpí. Závislost pozitivního výskytu *C. ochracea* z celku na krvácejících dásních vycházela 10,5 %. U občasného krvácení vycházela závislost pozitivního výskytu *C. ochracea* z celku 15,8 % a v případě, že nebylo přítomno žádné krvácení vyšel pozitivní výskyt *C. ochracea* v 32,9 %.

Tabulka 29 Krvácení dásní – výsledky pro *Capnocytophaga ochracea*

Krvácení dásní	Absolutní četnost odpovědí	Relativní četnost odpovědí v %	Relativní četnost pozitivního výskytu <i>C. ochracea</i> v % z celku	Relativní četnost negativního výskytu <i>C. ochracea</i> v % z celku
Ano	14	18,4	10,5	9,2
Ne	43	56,6	32,9	23,7
Někdy ano	19	25,0	15,8	7,9
Celkem	76	100,0	100,0	

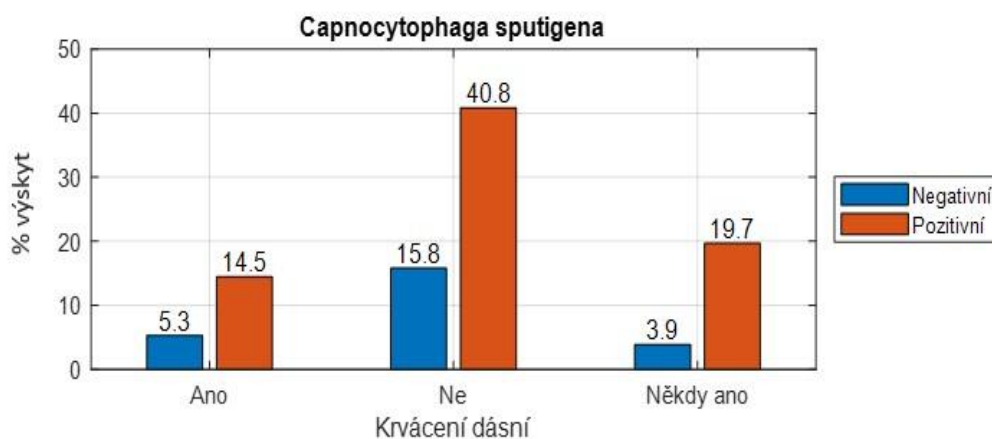


Graf 7 Graf závislosti výskytu *Capnocytophaga ochracea* na krvácení dásní

Závislost pozitivního výskytu *C. sputigena* z celku na krvácejících dásních vycházela v 14,5 % případů. U občasného krvácení vycházela závislost pozitivního výskytu *C. sputigena* z celku v 19,7 % a v případě, že nebylo přítomno žádné krvácení vyšel pozitivní výskyt *C. sputigena* u 40,8 %.

Tabulka 30 Krvácení dásní – výsledky pro *Capnocytophaga sputigena*

Krvácení dásní	Absolutní četnost odpovědí	Relativní četnost odpovědí v %	Relativní četnost pozitivního výskytu <i>C. sputigena</i> v % z celku	Relativní četnost negativního výskytu <i>C. sputigena</i> v % z celku
Ano	14	18,4	14,5	5,3
Ne	43	56,6	40,8	15,8
Někdy ano	19	25,0	19,7	3,9
Celkem	76	100,0	100,0	



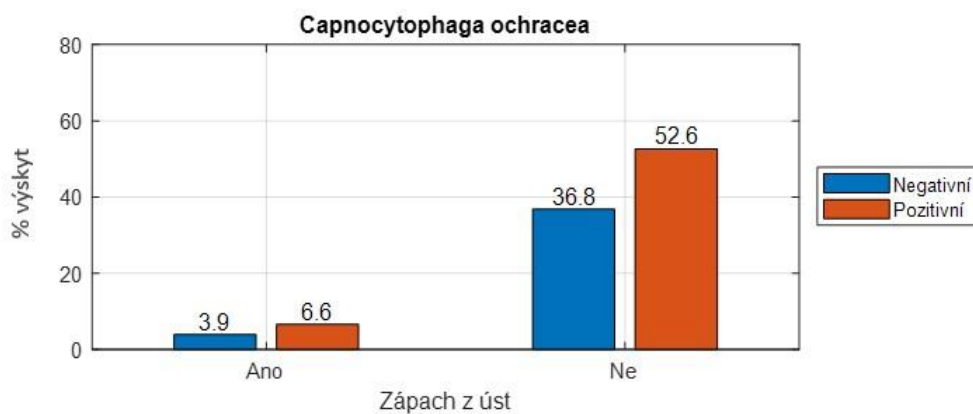
Graf 8 Graf závislosti výskytu *Capnocytophaga sputigena* na krvácení dásní

3.3.12 Otázka č. 13 – Pociťujete u sebe častý výskyt zápachu z úst?

Otázka č. 13 se zabývala tím, zda dotazovaní respondenti u sebe pozorují častý výskyt zápachu z úst (halitózy). Halitóza je jedním z mnoha příznaků patologických stavů parodontu. Častým zápachem z úst trpí přibližně 10 % respondentů, konkrétně 10,5 % a celkem 89,5 % si tohoto příznaku není vědomo. Závislost pozitivního výskytu *C. ochracea* z celku na pocitu častého zápachu z úst vycházela 6,6 %. V případě, že k těmto pocitům nedocházelo, vyšel pozitivní výskyt *C. ochracea* z celku v 52,6 %.

Tabulka 31 Zápach z úst, halitóza – výsledky pro *Capnocytophaga ochracea*

Zápach z úst	Absolutní četnost odpovědí	Relativní četnost odpovědí v %	Relativní četnost pozitivního výskytu <i>C. ochracea</i> v % z celku	Relativní četnost negativního výskytu <i>C. ochracea</i> v % z celku
Ano	8	10,5	6,6	3,9
Ne	68	89,5	52,6	36,8
Celkem	76	100,0	100,0	

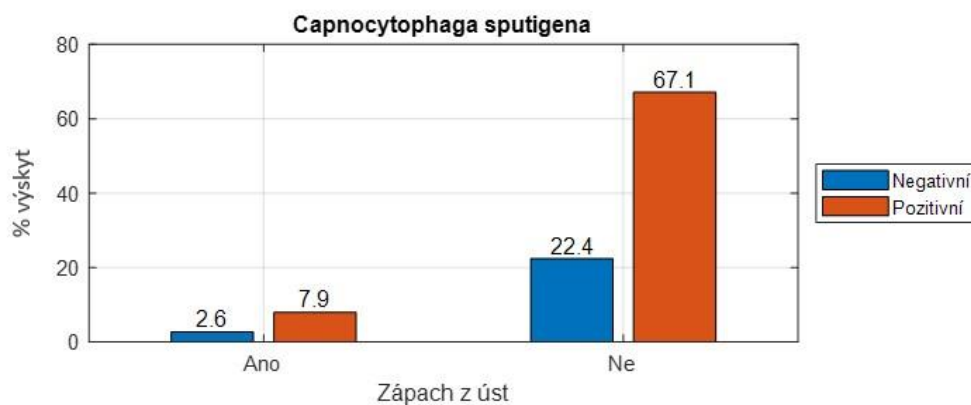


Graf 9 Graf závislosti výskytu *Capnocytophaga ochracea* na pocitu zápachu z úst

Závislost pozitivního výskytu *C. sputigena* z celku na pocitu častého zápachu z úst vycházela 7,9 %. Za předpokladu, že k těmto pocitům nedocházelo, vyšel pozitivní průkaz *C. sputigena* z celku v 67,1 %.

Tabulka 32 Zápach z úst, halitóza – výsledky pro *Capnocytophaga sputigena*

Zápach z úst	Absolutní četnost odpovědí	Relativní četnost odpovědí v %	Relativní četnost pozitivního výskytu <i>C. sputigena</i> v % z celku	Relativní četnost negativního výskytu <i>C. sputigena</i> v % z celku
Ano	8	10,5	7,9	2,6
Ne	68	89,5	67,1	22,4
Celkem	76	100,0	100,0	



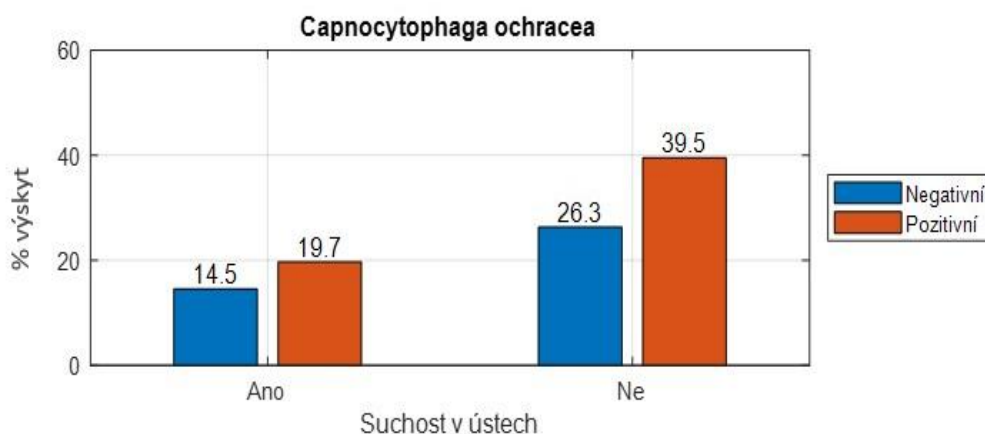
Graf 10 Graf závislosti výskytu *Capnocytophaga sputigena* na pocitu zápachu z úst

3.3.13 Otázka č. 14 – Vyskytují se u Vás občasné pocity suchosti v ústech?

Výskytem občasné suchosti v ústech (xerostomií) se u odpovídajících zabývala otázka č. 14. To, že se tento nepříjemný stav u dotazovaných vyskytuje častěji označilo 34,2 % a 65,8 % odpovědělo záporně, tj. že časté pocity suchosti v ústech se u nich nevyskytují. Závislost pozitivního výskytu *C. ochracea* z celku na častých pocitech suchosti v ústech vycházela 19,7 %. V případě, že k těmto pocitům nedocházelo, vyšel pozitivní výskyt *C. ochracea* z celku v 39,5 %.

Tabulka 33 Pocity suchosti v ústech, xerostomie – výsledky pro *Capnocytophaga ochracea*

Pocity suchosti v ústech	Absolutní četnost odpovědí	Relativní četnost odpovědí v %	Relativní četnost pozitivního výskytu <i>C. ochracea</i> v % z celku	Relativní četnost negativního výskytu <i>C. ochracea</i> v % z celku
Ano	26	34,2	19,7	14,5
Ne	50	65,8	39,5	26,3
Celkem	76	100,0	100,0	

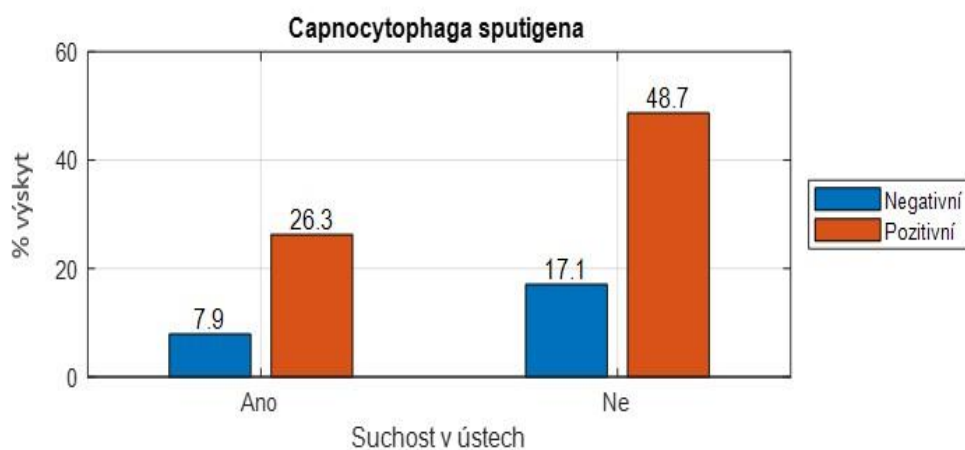


Graf 11 Graf závislosti výskytu *Capnocytophaga ochracea* na pocitech suchosti v ústech

V případě závislosti pozitivního výskytu *C. sputigena* z celku na častých pocitech suchosti v ústech vycházela tato závislost 26,3 %. Pokud k těmto pocitům nedocházelo, vyšel pozitivní výskyt *C. sputigena* z celku v 48,7 %.

Tabulka 34 Pocity suchosti v ústech, xerostomie – výsledky pro *Capnocytophaga sputigena*

Pocity suchosti v ústech	Absolutní četnost odpovědí	Relativní četnost odpovědí v %	Relativní četnost pozitivního výskytu <i>C. sputigena</i> v % z celku	Relativní četnost negativního výskytu <i>C. sputigena</i> v % z celku
Ano	26	34,2	26,3	7,9
Ne	50	65,8	48,7	17,1
Celkem	76	100,0	100,0	



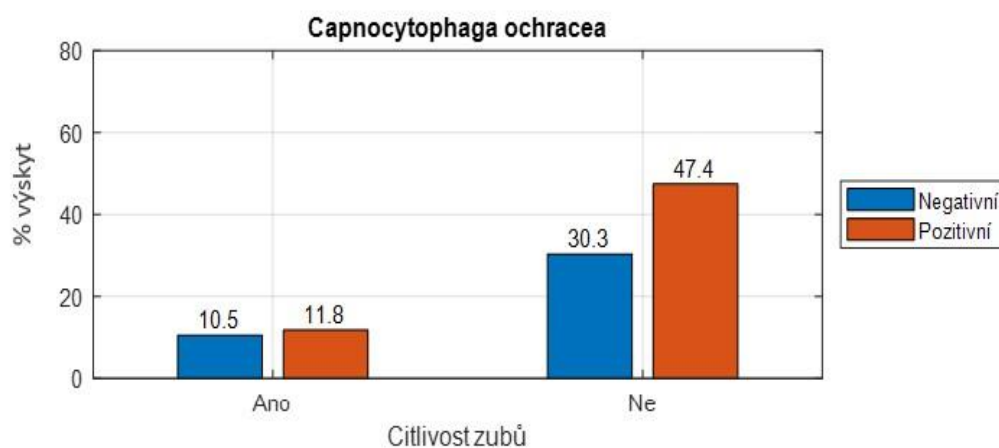
Graf 12 Graf závislosti výskytu *Capnocytophaga sputigena* na pocitech suchosti v ústech

3.3.14 Otázka č. 15 – Pozorujete u sebe zvýšenou citlivost zubů?

Poslední otázkou zaměřenou na subjektivní obtíže byla otázka č. 15, která se zabývala výskytem zvýšené citlivosti zubů u jednotlivých respondentů. 22,1 % u sebe v poslední době zpozorovalo zvýšenou citlivost zubů, nicméně nadpoloviční většina, tj. 77,6 % označila, že si zvýšené citlivosti vůbec nevšimla. Závislost pozitivního výskytu *C. ochracea* z celku na pocitech zvýšené citlivosti zubů vycházela 11,8 %. Jestliže však k těmto pocitům nedocházelo, vyšel pozitivní výskyt *C. ochracea* z celku v 47,4 %.

Tabulka 35 Zvýšená citlivost zubů – výsledek pro *Capnocytophaga ochracea*

Citlivost zubů	Absolutní četnost odpovědí	Relativní četnost odpovědí v %	Relativní četnost pozitivního výskytu <i>C. ochracea</i> v % z celku	Relativní četnost negativního výskytu <i>C. ochracea</i> v % z celku
Ano	17	22,4	11,8	10,5
Ne	59	77,6	47,4	30,3
Celkem	76	100,0	100,0	

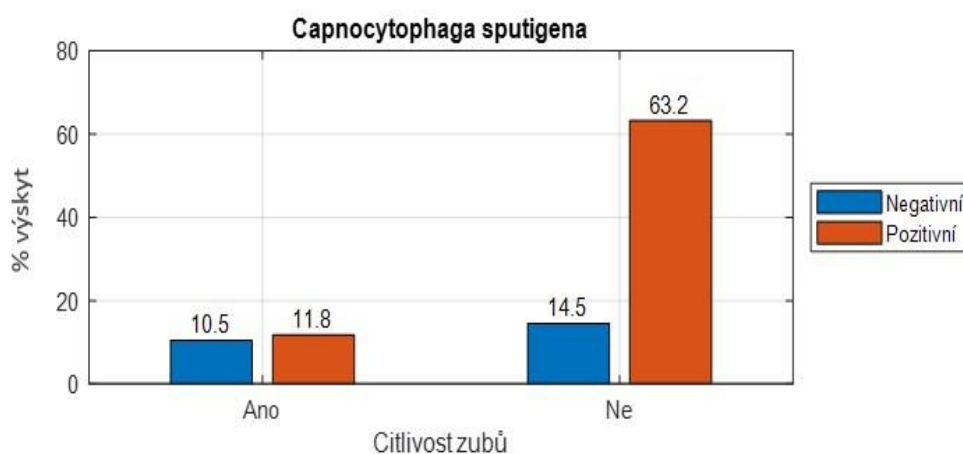


Graf 13 Graf závislosti výskytu *Capnocytophaga ochracea* na citlivosti zubů

Pozitivní výskyt *C. sputigena* z celku v závislosti na pocitech zvýšené citlivosti zubů vycházel 11,8 %. V případě, že však k těmto pocitům nedocházelo, vycházel pozitivní výskyt *C. sputigena* z celku v 63,2 %.

Tabulka 36 Zvýšená citlivost zubů – výsledek pro *Capnocytophaga sputigena*

Citlivost zubů	Absolutní četnost odpovědí	Relativní četnost odpovědí v %	Relativní četnost pozitivního výskytu <i>C. ochracea</i> v % z celku	Relativní četnost negativního výskytu <i>C. ochracea</i> v % z celku
Ano	17	22,4	11,8	10,5
Ne	59	77,6	63,2	14,5
Celkem	76	100,0	100,0	



Graf 14 Graf závislosti výskytu *Capnocytophaga sputigena* na citlivosti zubů

Otázky č. 16 a 17 se již nezabývaly obtížemi a problémy, ale zaměřovaly na oblast dentální hygieny.

3.3.15 Otázka č. 16 – Navštívil/Navštívila jste již někdy dentální hygienu?

V rámci tohoto dotazu odpovědělo více než 50 % respondentů, přesněji 53,9 % kladně, tj. že dentální hygienu již někdy v průběhu života navštívili. Nicméně téměř polovina, konkrétně 46,1 %, dentální hygienu dosud nenavštívila.

Tabulka 37 Návštěva dentální hygieny

Navštívil/Navštívila jste někdy dentální hygienu?	Absolutní četnost	Relativní četnost v %
Ano	41	53,9
Ne	35	46,1
Celkem	76	100,0

3.3.16 Otázka č. 12 – S jakou četností ji navštěvujete?

Poslední otázka dotazníkového šetření se zabývala četností návštěv dentální hygieny. Dotazovaní měli na výběr ze tří odpovědí – 1x za rok, 2x za rok a možnost Nenavštěvuji. Celkem 39,5 % označilo, že dentální hygienu navštěvují pravidelně 1x za rok, 11,8 % označilo, že dentální hygienu navštěvují dokonce 2x ročně a skoro polovina, tj. 48,7 %, odpověděla, že dentální hygienu nenavštěvuje vůbec.

Tabulka 38 Četnost návštěv

S jakou četností ji navštěvujete?	Absolutní četnost	Relativní četnost v %
1x za rok	30	39,5
2x za rok	9	11,8
Nenavštěvuji	37	48,7
Celkem	76	100,0

Součástí oddílu výsledků a diskuze v praktické části je i porovnání dotazníkového šetření s mojí bakalářskou prací ze třetího ročníku. V bakalářské práci (2022) jsem se věnovala mikroflóře dutiny ústní a jejím patologiím. Součástí práce byl také dotazník, který se zabýval kvalitou hygieny dutiny ústní populace a její znalostí o vybraných onemocněních. Dotazovaní byli rozděleni do různých věkových skupin, dle pohlaví, dále jak často prováděli orální hygienu, jaké prostředky pro to využívali, zda navštívili dentální hygienu a s jakou četností. Na závěr dotazníkového šetření jsem se ještě zajímala o znalost pojmů gingivitida a parodontitida jednotlivých dotazovaných. V této diplomové práci jsem provedla rovněž dotazníkové šetření, které se zabývalo nejen hygienou dotazovaných a jejich povědomím o pojmech gingivitida a parodontitida či návštěvou dentální hygieny, ale také jejich aktuálním stavem dutiny ústní. V rámci odmítnutí vzájemné spolupráce zubním lékařem, nebylo možné sestavit skupiny dobrovolníků/pacientů se zdravými dásněmi, s diagnostikovanou gingivitidou a diagnostikovanou parodontitidou, jak tomu bylo v předchozích studiích, tj. Hayashi et al. (2001) či Idate et al. (2020). Součástí dotazníkového šetření se tedy staly otázky týkající se aktuálního stavu dutiny ústní jednotlivých dotazovaných. To znamená, zda se u nich v současné době vyskytují oteklé a červeně zbarvené dásně, krvácení dásní, častý výskyt zápachu z úst a suchosti v ústech, ale také zda u sebe pozorují zvýšenou citlivost zubů. Na základě těchto doprovodných znaků bylo tedy možné vytvořit alespoň statistické zhodnocení výskytu vybraného druhu bakterie na konkrétních příznacích. Procentuální výsledky statistické závislosti pozitivního výskytu vybraného druhu *Capnocytophaga* na věku, pohlaví a klinických příznacích dutiny ústní byly vždy vztaženy k celkovému počtu dotazovaných.

Předmětem otázky č. 1 v diplomové práci bylo rozdělení všech dotazovaných, tj. 76 osob, do 5 věkových kategorií a sice: méně než 18, 18–30, 31–40, 41–50 a 51 a více. Do kategorie méně než 18 se řadilo 7,9 % dotazovaných (6 osob), do kategorie 18–30 se řadilo 55,3 % dotazovaných (42 osob), do kategorie 31–40 spadalo 3,9 % osob (3 osoby), do kategorie 41–50 15,8 % dotazovaných (12 osob) a do poslední skupiny 51 a více let se řadilo 17,1 % osob (13 osob). Závislost pozitivního průkazu *C. ochracea* na věkových kategoriích byla následující: pro osoby mladší 18 let vyšlo zastoupení *C. ochracea* 2,6 %, pro kategorii 18–30 let 32,9 %, 31–40 let 1,3 %, 41–50 let 13,2 % a pro kategorii 51 a více let 9,2 %. V případě *C. sputigena* vyšla závislost pozitivního průkazu na věkových kategoriích následovně: pro osoby mladší než 18 let vyšlo zastoupení *C. sputigena* 7,90 %, pro kategorii 18–30 let 42,1 %, pro 31–40 let 2,6 %, pro 41–50 let 14,5 % a pro kategorii 51 a více let 7,9 %. Na rozdíl od bakalářské práce jsem zde uvedla ještě kategorii méně než 18, kam spadaly osoby spíše pubertálního věku,

vzorky od dětí mladších 10 let nebyly předmětem zkoumání. Z výsledků je patrné, že nejvíce zastoupenou skupinou byla kategorie 18–30, v porovnání s výsledky z bakalářské práce, kde byla zastoupena spíše střední věková vrstva, je zřejmé zastoupení mladší věkové skupiny. Je to způsobeno zejména tím, že vzorky zubního plaku poskytovali nejčastěji studenti, zaměstnanci univerzity a členové jejich domácností, neboť při delším setrvání bakterií zubního plaku v transportním médiu, by předmětné bakterie v průběhu delšího transportu do laboratoře nemusely přežít. V otázce č. 2 proběhlo rozdělení dotazovaných na základě jejich pohlaví, dotazníkového šetření se tedy účastnilo 30,3 % mužů (23 osob) a 69,7 % žen (53 osob). V případě závislosti pozitivního výskytu *C. ochracea* na pohlaví vyšlo 18,4 % pro muže a 40,9 % pro ženy. *C. sputigena* se vyskytovala u 22,4 % mužů a 52,6 % žen. Ve studii Idate et al. (2020) sice neuvedli přesná procenta výskytu *C. gingivalis*, *C. granulosa* a *C. ochracea* pro každé pohlaví, ale závěrem zhodnotili, že prevalence těchto druhů byla vyšší u mužů se zdravým parodontem (42 %) a s diagnostikovanou gingivitidou (49 %), zatímco v případě žen se spíše vyskytovaly u pacientek s diagnostikovanou parodontitidou (40 %). Ve studii Shigeishi et al. (2024) prokázali spojitost výskytu *C. ochracea* na pohlaví, u mužů se *C. ochracea* vyskytovala v 39,1 % (36 osob) a u žen v 60,9 % (56 osob). Další aspekty jako věk a systematická onemocnění nehrály ve výskytu dané bakterie roli. V případě *C. sputigena* uvedli, že její výskyt nebyl ovlivněn věkem, pohlavím a systematickými onemocněními, nicméně z hlediska výskytu tohoto druhu u pohlaví se u mužů potvrdil v 31,9 % (36 osob) a u žen v 68,1 % (77 osob). Z těchto výsledků usuzují, že navzdory prohlášení vědecké skupiny Shigeishi et al. (2024) je možné pozorovat přeci jen určitou spojitost mezi výskytem *C. sputigena* a pohlavím.

Průzkum v bakalářské práci ukázal, že se šetření účastnilo celkem 125 osob, které byly rozděleny do 4 věkových kategorií. Jednalo se o kategorie 18–30, 31–50, 51–60 a 61 a více. Kategorie 18–30 byla zastoupena 36,0 % (45 osob), kategorie 31–50 48,0 % (60 osob), kategorie 51–60 12,8 % (16 osob) a poslední skupinu 61 a více let zastupovalo pouze 3,20 % dotazovaných (4 osoby). Z hlediska pohlaví se průzkumu účastnilo 34,4 % mužů (43 osob) a 65,6 % žen (82 osob). Na počátku praktické části jsem si stanovila hypotézy, na jejichž podkladě jsem poté vyhodnocovala výsledky dotazníkového šetření. Jednou z hypotéz bylo, že z odpovídajících respondentů bude větší procento žen než mužů, přičemž podle výsledků bylo zjevné, že se tato hypotéza potvrdila. Stejného výsledku dosáhlo i zhodnocení odpovědí z diplomové práce, tj. že se studie zúčastní více žen než mužů.

Otázky č. 3, 4 a 5 v diplomové práci se zabývaly kvalitou hygieny dutiny ústní jednotlivých respondentů a prostředky, které k této činnosti využívají. Otázka č. 3 se zaměřovala na pravidelnost čištění dutiny ústní, na výběr měli dotazovaní z možností 3x denně každý den, 2x denně každý den, 1x denně, po každém jídle a možnost neprovádím. Možnost 3x denně každý den neoznačil nikdo z dotazovaných, tj. 0,0 % (0 osob), 2x denně každý den zvolilo 92,1 % (70 osob), 1x denně označilo 7,9 % (6 osob). Zbývající možnosti, tj. po každém jídle a neprovádím, neoznačil nikdo z dotazovaných. Otázka č. 4 se zabývala pomůckami pro udržení čistoty dutiny ústní, 31,6 % (24 osob) označilo, že využívají pouze zubní kartáček, 30,3 % (23 osob) zvolilo možnost zubní kartáček a mezizubní kartáček/kartáčky, 22,4 % (17 osob) označilo možnost zubní kartáček, mezizubní kartáček/kartáčky a jednosvazkový kartáček. Celkem 5,3 % (4 osoby) zvolilo zubní kartáček, mezizubní kartáček/kartáčky, dentální nit a 1,3 % (1 osoba) označilo možnost zubní kartáček, mezizubní kartáček/kartáčky, dentální nit, ústní sprcha. V rámci této otázky byla na výběr ještě jedna možnost, a to odpověď Jiné, u níž mohli dotazovaní vypsát svoji preferovanou odpověď. Tuto možnost využilo 9,2 % (7 osob), avšak jednalo se spíše o různé kombinace předchozích variant. Poslední otázka z tohoto úseku, otázka č. 5, se dotazovala, zda se respondenti zaměřují během čištění dutiny ústní také na dásňové žlábků. Kladně odpovědělo 50,0 % (38 osob) a možnost že se na čištění žlábků nezaměřují zvolilo 50,0 % dotazovaných (38 osob). Tato čísla mě velice překvapila, neboť jsem očekávala, že v současné době, kdy existuje mnoho zdrojů informací o orálním zdraví a klade se velký důraz na vzhled dutiny ústní, budou procenta kladné odpovědi o něco vyšší.

V bakalářské práci v rámci otázky, jak často provádí dotazovaní orální hygienu odpovědělo 13,6 % ze 125 účastníků (17 osob), že hygienu dutiny ústní provádí 1x denně, 84,0 % (105 osob) 2x denně a možnost po každém jídle zvolilo 2,4 % (3 osoby). V otázce na prostředky pro udržení čistoty dutiny ústní měli dotazovaní na výběr možnosti: zubní kartáček, mezizubní kartáčky, ústní voda, dále možnost pouze zubní kartáček, možnost pouze ústní vodu a na závěr odpověď Jiné, kde mohli dotazovaní vypsát své preferované odpovědi. První možnost, tj. zubní kartáček, mezizubní kartáčky, ústní voda zvolilo 72,0 % dotazovaných (90 osob), možnost pouze zubní kartáček zvolilo 16,8 % (21 osob), pouze ústní vodu neoznačil žádný dotazovaný, tj. 0,0 % a možnost Jiné označilo 11,2 % dotázaných (14 osob). Tato možnost zahrnovala odpovědi jako jednosvazkový kartáček, dentální párátko, dentální nit a zubní sprcha. Při porovnání těchto výsledků s výsledky odpovědi v diplomové práci je možné

řící, že v současné době je postupné využívání ústní sprchy jako běžné součásti orální hygieny na vzestupu, toto tvrzení platí i o kvalitě čištění.

Otázka č. 6 se v diplomové práci zabývala tím, zda jsou dotazovaní respondenti aktivními kuřáky či nikoliv. Bohužel tato otázka byl přidána do dotazníku až později a nestala se tak předmětem statistického vyhodnocení závislosti výskytu *C. ochracea* a *C. sputigena* na kouření. V rámci této otázky odpovědělo ze všech 52 zbývajících dotazovaných kladně pouze 1,9 % (1 osoba), zbytek tj. 98,1 % (51 osob) se za aktivního kuřáka nepovažovalo. Přestože na tuto otázku nemohli odpovědět všichni, velmi mě tato čísla překvapila. Výskyt aktivních kuřáků jsem očekávala mnohem vyšší. Otázky č. 7, 8 a 9 se zabývaly povědomím veřejnosti o onemocněních gingivitida a parodontitida. 19,7 % respondentů (15 osob) odpovědělo, že se s pojmem gingivitida již někdy v minulosti setkala, zatímco 80,3 % (61 osob) zvolilo negativní odpověď. Takový výsledek jsem upřímně předpokládala, neboť pojem gingivitida není nikde příliš uváděn a pokud se nejedná o člověka, který je více zainteresovaný do oblasti zubního lékařství či dentální hygieny, případně neměl-li s tímto onemocněním osobní zkušenost, tak si takového pojmu nemůže být vědom. V rámci dotazu na parodontitidu byla již četnost pozitivních odpovědí vyšší, a to 59,2 % (45 osob), zatímco s pojmem parodontitida se dosud nesetkalo 40,8 % dotazovaných (31 osob). Nicméně v tomto případě jsem očekávala výsledek výrazně lepší. Pojem parodontitida, resp. parodontóza, je poměrně rozšířený ať už ve spojitosti s reklamními produkty, medializací přístupů pro správnou péči o zdraví dutiny ústní či v případě propagačních letáků v čekárnách zubních lékařů, ev. dentální hygieny. Proto mě velmi udivilo, že o tomto onemocnění slyšelo tak nízké procento lidí. Otázka č. 9 se zabývala tím, zda by respondenti věděli, jaký je mezi výše zmíněnými onemocněními rozdíl a aby uvedli správnou odpověď. Kladně odpovědělo 13,2 % (10 osob), 51,3 % (39 osob) zvolilo striktně zápornou odpověď a 35,5 % (27 osob) odpovědělo, že si nejsou příliš jisti, co přesně tyto pojmy znamenají. Bohužel pouze 3 osoby dokázaly správně uvést, jaký je mezi těmito onemocněními rozdíl. V otázce č. 10 byli dotazovaní tázáni, zda měli již někdy s těmito onemocněními problémy, nicméně podmínkou bylo, že v případě, že na předchozí tři otázky odpověděli záporně, nebudou tedy odpovídat ani nyní. 18,4 % (9 osob) zvolilo, že s těmito onemocněními již někdy v minulosti měli určité problémy, avšak 81,6 % (40 osob) odpovědělo, že se s těmito onemocněními dosud nepotýkalo. Problémem však u této otázky byla nejspíše horší formulace či nepozornost odpovídajících, neboť celkový počet odpovědí dosahoval hodnoty 49.

Výsledky této části studie je možné porovnat s výsledky bakalářské práce, kde jsem se rovněž zabývala povědomím veřejnosti o onemocněních gingivitida a parodontitida. V bakalářské práci se v rámci otázky ohledně znalosti pojmu gingivitidy vyslovilo kladně 39,2 % dotazovaných (49 osob) a 60,8 % (76 osob) zvolilo možnost, že o něm nikdy neslyšeli. V případě otázky na onemocnění parodontitida, byly výsledky již lepší, neboť o tomto onemocnění slyšelo celkem 98,4 % (123 osob) a záporně odpovědělo pouze 1,6 % dotazovaných (2 osoby). Podmínka hypotézy týkající se znalosti pojmu gingivitida, tj. že 50 % všech dotazovaných alespoň slyšelo o pojmu gingivitida, se nepotvrdila. Hypotéza týkající se onemocnění parodontitida se sice potvrdila, avšak pouze z části, neboť se zabývala nejen povědomím o existenci tohoto pojmu jako takovém, ale také znalostí tohoto onemocnění. Celé znění hypotézy tedy bylo, že alespoň 60 % dotazovaných slyšelo o pojmu parodontitida, resp. parodontóza a vědělo, o jaké onemocnění se jedná. Jak bylo uvedeno výše, o tomto pojmu slyšelo 98,4 %, nicméně správnou odpověď týkající se toho, o jaké onemocnění se jedná, zvolilo pouze 44,8 % (56 osob). Z těchto výsledků je tedy možné říci, že znalost pojmů z oblasti parodontologie byla mnohonásobně větší u respondentů v bakalářské práci než v případě diplomové práce. Tento výsledek je pravděpodobně způsoben tím, že větší skupinu respondentů z hlediska věku zaujímali mladší jedinci, tj. věková kategorie 18–30 let, kdežto v případě bakalářské práce se jednalo spíše o jedince ve středním věku, u nichž byla již větší pravděpodobnost osobní zkušenosti s těmito onemocněními.

Otázky č. 11–15 v diplomové práci se u jednotlivých dotazovaných zabývaly aktuálními příznaky parodontopatií, mezi něž se řadily kupříkladu oteklé a červeně zbarvené dásně, krvácení dásní, zápach z úst, pocity suchosti v ústech a zvýšená citlivost zubů. Tyto příznaky bývají často uváděny jako doprovodné znaky zánětu dásní (gingivitidy) a posléze zánětu závěsného aparátu zubu (parodontitidy). Ohledně výskytu zduřelých a červeně zbarvených dásní se kladně vyjádřilo 6,6 % dotazovaných (5 osob), zatímco 93,4 % (71 osob) si těchto znaků nebylo vědomo. Závislosti pozitivního výskytu *C. ochracea* a *C. sputigena* na zduřelých a červených dásních dosahovaly pouhých 3,9 % u *C. ochracea* a 5,3 % u *C. sputigena*. V tomto případě tedy není možné zcela říci, zda je u oteklých dásní nějaká souvislost s výskytem těchto bakterií. V otázce č. 12 zabývající se krvácením dásní, odpovědělo kladně 18,4 % (14 osob), 25,0 % (19 osob) odpovědělo, že u nich dochází k občasnému krvácení a 56,6 % (43 osob) v současné době krvácením netrpí. Závislosti pozitivního výskytu *C. ochracea* a *C. sputigena* u krvácejících dásní vycházely pro *C. ochracea* 10,5 %, pro *C. sputigena* 14,5 %. V případě závislosti pozitivního výskytu těchto bakterií na občasném krvácení dosahovaly

pro *C. ochracea* 15,8 % a *C. sputigena* 19,7 %. Z těchto výsledků je možné usuzovat, že závislosti pozitivního průkazu obou druhů bakterií na krvácení, nabývají na významu a objevuje se určitá spojitost mezi výskytem bakterie a krvácením. Otázka č. 13 se zabývala tím, zda dotazovaní u sebe pocítují častý výskyt zápachu z úst. Možnost ano zvolilo 10,5 % osob (8 osob) a možnost ne označilo 89,5 % (68 osob). Závislost pozitivního průkazu bakterií *C. ochracea* a *C. sputigena* na pocitech zápachu z úst vycházely pro *C. ochracea* 6,6 % a pro *C. sputigena* 7,9 %. Výsledky těchto závislostí je možné shrnout jako v případě oteklých dásní a to tak, že není možné zcela říci, zda se mezi výskytem bakterií a halitózou vyskytuje nějaká souvislost. Otázka č. 14 se zabývala tím, zda dotazovaní mívají časté pocity suchosti v ústech, 34,2 % (26 osob) odpovědělo ano a 65,8 % (50 osob) zvolilo možnost ne. Závislost pozitivního průkazu *C. ochracea* na pocitu suchosti v ústech vyšla 19,7 % a pro *C. sputigena* 26,3 %. Z těchto výsledků lze usuzovat, že občasné pocity suchosti mohou mít určitý vliv na výskyt obou bakterií. Poslední otázka týkající se příznaků, otázka č. 15, se zajímala o to, zda u sebe dotazovaní v současné době pocítují zvýšenou citlivost zubů. 22,4 % dotazovaných (17 osob) zvolilo kladnou odpověď a 77,6 % (59 osob) odpovědělo negativně. Výsledky závislosti výskytu *C. ochracea* a *C. sputigena* na citlivosti zubů vyšly totožné, a to 11,8 %. V rámci této závislosti pozitivního výskytu obou bakterií na pocitech zvýšené citlivosti zubů, je možné konstatovat, že zde také nebude výrazná spojitost jako tomu bylo v případě oteklých dásní a pocitech zápachu z úst. K podobnému závěru dospěla rovněž i vědecká skupina Shigeishi et al. (2024). Nicméně uvedli vzhledem ke stavu parodontu, že *C. ochracea* pozitivní jedinci měli hlubší parodontální kapsy (≥ 4 mm) doprovázené krvácením po sondáži, než *C. ochracea* negativní jedinci. Stejně tomu bylo i v případě *C. sputigena*. Nicméně procentuální rozdíly nebyly velké a toto hodnocení nenabývalo nikterak velkého významu. Mezi další aspekty, které označili za nevýznamné pro statistické zhodnocení, spadaly i klinické příznaky orálních patologií.

Poslední dvě otázky studie v této diplomové práci, tj. otázky č. 16 a 17, se věnovaly návštěvnosti dentální hygieny. V otázce č. 16 byli jednotliví respondenti dotázováni, zda již někdy navštívili dentální hygienu a otázka č. 17 se zabývala tím, s jakou četností ji navštěvují či nenavštěvují. Dentální hygienu dosud navštívilo 53,9 % dotazovaných (41 osob) a 46,1 % (35 osob) dentální hygienu doposud nenavštívilo. Z hlediska pravidelnosti návštěvy odpovědělo 39,5 % (30 osob), že dentální hygienu navštěvují 1x za rok, 2x za rok ji navštěvuje 11,8 % (9 osob) a možnost nenavštěvují zvolilo celkem 48,7 % dotázaných (37 osob). Navzdory již výše zmíněnému názoru ohledně nároků současné společnosti na vzhled, jsem opět

překvapena nízkou návštěvností dentální hygieny. Právě v současné době, kdy je tento obor poměrně na vrcholu, bych předpokládala, že návštěva a pravidelnost návštěv dentální hygieny bude výrazně vyšší.

Součástí bakalářské práce byla rovněž otázka ohledně návštěvnosti dentální hygieny. V otázce, zda respondenti již někdy navštívili specialistu či specialistku na dentální hygienu odpovědělo kladně 72,8 % osob (91 osob) a záporně 27,8 % (34 osob). Na otázku, s jakou četností jej/ji navštěvují zvolilo 32,8 % dotázaných (41 osob) možnost 1x za rok, 26,4 % (33 osob) zvolilo možnost 2x za rok, 12,8 % (16 osob) odpovědělo, že specialistu/specialistku navštěvují 1x za 2 roky a 28,0 % (35 osob) odpovědělo, že dentální hygienu nenavštěvují vůbec. Hypotéza, kterou jsem si v rámci své práce stanovila byla, že alespoň 30 % z celkového počtu dotazovaných navštěvuje/navštívilo dentální hygienu více než 1x. Na základě odpovědí bylo tedy možné prohlásit, že se tato hypotéza potvrdila. Z porovnání odpovědí v bakalářské práci s odpověďmi diplomové práce je možné říci, že v případě bakalářské práce byla návštěvnost dentální hygieny a pravidelnost návštěv výrazně vyšší než v případě diplomové práce.

4 ZÁVĚR

Nedostatečná či nesprávná hygiena dutiny ústní je hlavním předpokladem pro přemnožení patogenních i oportunně patogenních mikroorganismů, které mají vliv na rozvoj různých patologických stavů. Tyto stavy se však striktně nemusejí týkat pouze dutiny ústní, ale mohou se skrze systém krevního řečiště dostat do celého těla a způsobit tak vážné zdravotní komplikace. Jedním z mnoha oportunitních patogenů je i bakteriální rod *Capnocytophaga*, který je součástí běžné mikrobiální flóry dutiny ústní člověka i zvířat. Humánně-orální druhy však nepatří u potenciálně zdravého jedince mezi hlavní vyvolavatele infekcí. Nicméně v případě imunokompromitovaných osob mohou různé druhy tohoto rodu způsobovat bakteriémie, systémové infekce a ohrožovat tak imunitně slabého jedince na životě.

V úvodu teoretické části jsem se zabývala anatomickou stavbou dutiny ústní, jejím fyziologickým mikrobiálním osídlením a její obranou. Následně jsem se více věnovala kapitolám zaměřujícím se na vznik zubního plaku, popisu a klasifikaci vybraných patologií parodontu, zejména gingivitidě a parodontitidě a vlivu kouření na stav dutiny ústní. V další části práce jsem se věnovala kapnofilním bakteriím a rodu *Capnocytophaga*, jeho klasifikaci, vlastnostem a vybraným druhům. V závěru teoretické části jsem ještě zmínila různé možnosti laboratorní diagnostiky této bakterie.

V praktické části diplomové práce jsem se zabývala průkazem bakterie rodu *Capnocytophaga* pomocí kultivačních a molekulárně biologických metod. Součástí praktické části také byl dotazník, který se zabýval povědomím laické veřejnosti o vybraných patologiích dutiny ústní, prostředky pro udržení jejího zdraví a jejich aktuálními klinickými příznaky. V návaznosti na získané odpovědi bylo vytvořeno statistické zhodnocení závislosti výskytu druhů *Capnocytophaga ochracea* a *Capnocytophaga sputigena* na věku, pohlaví a symptomech.

V rámci této práce bylo zkoumáno celkem 76 vzorků stěrů zubního plaku dutiny ústní člověka, u nichž proběhl pokus o izolaci čisté kultury *Capnocytophaga* spp. na modifikovaném krevním agaru s 10 % sterilní beraní krve a gentamicinem a průkaz vybraných druhů pomocí molekulárně biologických metod. Jako referenční kmeny byly využity *Capnocytophaga gingivalis* CCM 3710, *Capnocytophaga ochracea* CCM 3711, *Capnocytophaga sputigena* CCM 3712. U odebraných vzorků zubního plaku se dále pomocí PCR metody a následné gelové elektroforézy potvrdila přítomnost druhů *C. gingivalis*, *C. ochracea* a *C. sputigena*. Pro identifikaci jednotlivých druhů byl využit protokol od Fumiko Hayashi et al. z roku 2001

a diplomová práce z roku 2023, která se odkazovala na postupy z publikace od Michio Suzuki et al. z roku 2010.

Izolace čisté kultury se na modifikovaném krevním agaru sice nezdařila, nicméně kultivace tohoto bakteriálního rodu se v případě vzorku č. 51 úspěšně zdařila. Touto cestou bylo tedy ověřeno, že zmíněný modifikovaný krevní agar není zcela vhodný pro izolaci a kultivaci bakterie *Capnocytophaga* spp., jež vyžaduje pro svůj růst dosti náročné kultivační podmínky a speciálně upravená média. Z tohoto důvodu nelze mnohdy na kultivačních miskách odhalit jeho kolonie, neboť jsou vlivem přítomnosti dalších bakterií překryty.

V návaznosti na tuto skutečnost byla pro detekci a identifikaci využívána již optimalizovaná metoda PCR s využitím gelové elektroforézy. Celkem bylo tedy otestováno všech 76 reálných vzorků na přítomnost *C. gingivalis*, *C. ochracea* a *C. sputigena*. 59,21 % vykazovalo pozitivitu na *C. ochracea* a 75,00 % na *C. sputigena*. Avšak v případě *C. gingivalis* dosahovala pozitivita i po výměně primerů 100,00 %.

Z výsledků dotazníkového šetření pro průkaz závislosti jednotlivých druhů *Capnocytophaga* na věku, pohlaví a příznacích vyplynulo, že se stoupajícím věkem má prevalence výskytu obou druhů spíše sestupný charakter. Nicméně závislost pozitivního průkazu jednotlivých druhů na pohlaví není možné příliš porovnávat, neboť se jednalo o nesterilně velké skupiny s velkou početní převahou žen. V případě symptomů byla rovněž patrná určitá souvislost mezi pozitivním průkazem obou druhů a krvácejícími dásněmi. K tomuto závěru se došlo i v případě závislosti výskytu obou druhů na občasném pocitu suchosti v ústech.

Získané výsledky tedy dokazují, že za pomoci tradičních kultivačních metod není možné provést dostatečnou identifikaci rodu *Capnocytophaga* a je nutné využívat již pokročilejší metody zabývající se molekulární podstatou této bakterie. Vysoké procentuální zastoupení jednotlivých druhů poukazuje na to, že se skutečně jedná o přirozenou součást orální mikroflóry, nicméně při nesprávné či nedostatečné hygieně může docházet ke vzniku zánětů, které mohou nabývat lokálního až systémového charakteru. Na závěr bych chtěla říci, že přestože se některé mé předpoklady a očekávání nepotvrdily, informovanost laické veřejnosti je dostačující a má jisté povědomí o vzniku parodontálních onemocnění. Z hlediska kvality hygieny, je možné sledovat, že velká část populace využívá pro udržení zdraví dutiny ústní velké množství různých prostředků, a to se odráží na její vysoké úrovni. Prostřednictvím

takovýchto postupů je tedy možné zamezit vzniku závažných zdravotních komplikací, které by mohly mít i fatální následky.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ABÍKOVÁ, Taťána a URBANOVÁ, Wanda, 2017. *Magazín Komory zubních techniků ČR: Slina a její význam - 1. část složení sliny*. Online. Roč. 2017, č. 1. Praha 5. ISSN m1804-3720. Dostupné z: https://komorazt.cz/wp-content/uploads/2017/10/magazin_zmensena_verze.pdf. [cit. 2024-05-04].
2. AL BATAINEH, Mohammad Tahseen; DASH, Nihar Ranjan; ELKHAZENDAR, Mohammed; ALNUSAIRAT, Dua'a Mohammad Hasan; DARWISH, Islam Mohammad Ismail et al., 2020. Revealing oral microbiota composition and functionality associated with heavy cigarette smoking. Online. *Journal of Translational Medicine.*, Roč. 18, č. 1. ISSN 1479-5876. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02579-3>. [cit. 2024-02-18].
3. ALBERTS, Bruce, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER, 1994–2002. *Molecular Biology of the Cell: The Structure and Function of DNA*. Online. 4. *Garland Science*, NBK26821. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26821/>. [cit. 2024-03-13].
4. ALGAHAWI, Ahmed; HARJU, Inka; KÖNÖNEN, Eija; RANTAKOKKO-JALAVA, Kaisu a GÜRISOY, Mervi, 2024. Factors affecting the quality and reproducibility of MALDI-TOF MS identification for human Capnocytophaga species. Online. *Journal of Microbiological Methods*. ISSN 01677012. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2024.106911>. [cit. 2024-03-23].
5. ALY, Sanaa M. a SABRI, Dalia M., 2015. Next generation sequencing (NGS): a golden tool in forensic toolkit. Online. *Archives of Forensic Medicine and Criminology*. Roč. 4, s. 260-271. ISSN 0324-8267. Dostupné z: <https://doi.org/10.5114/amsik.2015.61029>. [cit. 2024-03-23].
6. ANTEZACK, Angéline; BOXBERGER, Manon; LA SCOLA, Bernard a MONNET-CORTI, Virginie., 2021. Isolation and Characterization of Capnocytophaga bilenii sp. nov., a Novel Capnocytophaga Species Detected in a Gingivitis Subject. Online. *Pathogens*. Roč. 10, č. 5. ISSN 2076-0817. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pathogens10050547>. [cit. 2024-02-02].

7. BELÁK, Šimon; STAROSTA, Martin; ŽIŽKA, Radovan a ŠEDÝ, Jiří. Nová klasifikace parodontálních a periimplantátových onemocnění. Online. *LKS - Recenzovaný časopis České stomatologické komory*. Roč. 29, č. 1, s. 10-17. ISSN 2571-2411. Dostupné z: https://www.lks-casopis.cz/clanek/nova-klasifikace-parodontalnich-a-periimplantatovych-onemocneni/?fbclid=IwAR3zLjj0fdv5DOIRmcEmjCA-DlaXpCH8E9gzjRsFYqH-i-Jg_hzl8CjZwjc. [cit. 2024-05-03].
8. BILGRAMI, S, S K BERGSTROM, D E PETERSON, D R HILL, N DAINIAK, J J QUINN a J L ASCENSAO., 1992. Capnocytophaga bacteremia in a patient with Hodgkin's disease following bone marrow transplantation: case report and review. Online. *Clinical Infectious Diseases*. Roč. 14, č. 5, s. 1045-1049. ISSN 1537-6591. [cit. 2024-03-16]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1600004/>
9. BOLMSTROM, A a KARLSSON, A., 2002. Influence of CO2 incubation on quinolone activity against Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae. Online. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Roč. 42, č. 1, s. 65-69. ISSN 07328893. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(01\)00338-8](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(01)00338-8). [cit. 2024-03-16].
10. CIANTAR, Marilou; NEWMAN, Hubert N.; WILSON, Michael a SPRATT, David A., 2005. Molecular Identification of Capnocytophaga spp. via 16S rRNA PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. Online. *Journal of Clinical Microbiology*. Roč. 43, č. 4, s. 1894-1901. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1894-1901.2005>. [cit. 2024-04-30].
11. CLARRIDGE, Jill E., 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Online. *Clinical Microbiology Reviews*. Roč. 17, č. 4, s. 840-862. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>. [cit. 2024-03-23].
12. ČIHÁK, Radomír a GRIM, Miloš, 2013. *Anatomie 2: Dutina ústní*. 3. upravené a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, s. 512. ISBN 978-80-247-4788-0.
13. DESAI, Sima S.; HARRISON, Rebecca A. a MURPHY, Melissa D., 2007. Capnocytophaga ochracea causing severe sepsis and purpura fulminans in an immunocompetent patient. Online. *Journal of Infection*. Roč. 54, č. 2, s. 107-109. ISSN 01634453 Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.06.014>. [cit. 2024-02-01].

14. DINGLE, Tanis C. a BUTLER-WU, Susan M., 2013. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. Online. *Clinics in Laboratory Medicine*. Roč. 33, č. 3, s. 589-609. ISSN 02722712. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cll.2013.03.001>. [cit. 2024-03-19].
15. DOSTÁLOVÁ, Tatjana a BEZNOSKOVÁ SEYDLOVÁ, Michaela., 2008. *Stomatologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2700-4.
16. EUZÉBY, Jean Paul Maria a Aidan C. PARTE., 1997. LPSN- LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE. Capnocytophaga. Online. *LPSN- List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*. Dostupné z: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=capnocytophaga>. [cit. 2024-01-16].
17. EUZÉBY, Jean Paul Maria a Aidan C. PARTE., 1997. LPSN- LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE. Capnocytophaga gingivalis. Online. *LPSN- List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*. Dostupné z: <https://lpsn.dsmz.de/species/capnocytophaga-gingivalis>. [cit. 2024-01-16].
18. EUZÉBY, Jean Paul Maria a Aidan C. PARTE., 1997. LPSN- LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE. Capnocytophaga haemolytica. Online. *LPSN- List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*. Dostupné z: <https://lpsn.dsmz.de/species/capnocytophaga-haemolytica>. [cit. 2024-01-16].
19. FABRE, Shelcie; MALIK, Yesha; VAN DE GUCHTE, Adriana; DELGADO-NOGUERA, Lourdes A.; GITMAN, Melissa R. et al., 2021. Catheter-related bloodstream infection due to biofilm-producing Capnocytophaga sputigena. Online. *IDCases*. Roč. 25. ISSN 22142509. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2021.e01231>. [cit. 2024-02-01].
20. FAMUYIDE, Akinrinola; MASSOUD, Tarik F. a MOONIS, Gul., 2022. Oral Cavity and Salivary Glands Anatomy. Online. *Neuroimaging Clinics of North America*. Roč. 32, č. 4, s. 777-790. ISSN 10525149. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.nic.2022.07.021>. [cit. 2024-01-25].
21. FORLENZA, Susan W, 1991. Capnocytophaga: An update. PDF; online. *Clinical Microbiology Newsletter*. Roč. 13, č. 12, s. 89–91. ISSN 01964399. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0196-4399\(91\)90021-M](https://doi.org/10.1016/0196-4399(91)90021-M). [cit. 2024-04-30].

22. FRANDBSEN, E. V. G.; POULSEN, K.; KONONEN, E. a KILIAN, M., 2008. Diversity of Capnocytophaga species in children and description of Capnocytophaga leadbetteri sp. nov. and Capnocytophaga genospecies AHN8471. Online. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. Roč. 58, č. 2, s. 324-336. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65373-0>. [cit. 2024-02-02].
23. GAASTRA, Wim a LIPMAN, Len J.A., 2010. Capnocytophaga canimorsus. Online. *Veterinary Microbiology*. Roč. 140, č. 3-4, s. 339-346. ISSN 03781135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.040>. [cit. 2024-02-01].
24. GASMI BENAHMED, Asma; GASMI, Amin; DADAR, Maryam; ARSHAD, Maria a BJØRKLUND, Geir, 2021. The role of sugar-rich diet and salivary proteins in dental plaque formation and oral health. Online. *Journal of Oral Biosciences*. Roč. 63, č. 2, s. 134-141. ISSN 13490079. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.job.2021.01.007>. [cit. 2024-01-31].
25. GE, Zhiqiang; SUN, Tingting; XING, Jinfeng a FAN, Xuejiao, 2019. Efficient removal of ethidium bromide from aqueous solution by using DNA-loaded Fe₃O₄ nanoparticles. Online. *Environmental Science and Pollution Research*. Roč. 26, č. 3, s. 2387-2396. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3747-7>. [cit. 2024-02-01].
26. GHANNAM, Jack, Jason WANG a Arif JAN, 2023. *Biochemistry, DNA Structure*. Online. StatPearls Publishing, PMID 30855829. Dostupné z: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538241/. [cit. 2024-03-13].
27. *Gifu Anaerobic Broth (GAM)*. Online. In: HIMEDIA LABORATORIES PRIVATE LIMITED. Dostupné z: https://mrg.cau.ac.kr/Gifu_Anaerobic_Broth_GAM_Broth.pdf. [cit. 2024-05-03].
28. GOLDSTEIN, E J, D E PETERSON a B D KIRBY., 1979. Isolation of Eikenella corrodens from pulmonary infections. *American Review of Respiratory Disease*. Online. Roč. 119, č. 1, s. 55-58. ISSN 1535-4970. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/369416/>. [cit. 2024-03-16].
29. GROEGER, Sabine a MEYLE, Joerg, 2019. Oral Mucosal Epithelial Cells. Online. *Frontiers in Immunology*. Roč. 10. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00208>. [cit. 2024-05-03].
30. GUPTA, Nalini., 2019. DNA extraction and polymerase chain reaction. Online. *Journal of Cytology*. Roč. 36, č. 2. ISSN 0970-9371. Dostupné z: https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18. [cit. 2024-02-01].

31. HANDFIELD, M.; BAKER, H.V. a LAMONT, R.J., 2008. Beyond Good and Evil in the Oral Cavity: Insights into Host-Microbe Relationships Derived from Transcriptional Profiling of Gingival Cells. Online. *Journal of Dental Research*. Roč. 87, č. 3, s. 203-223. ISSN 0022-0345. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/154405910808700302>. [cit. 2024-01-21].
32. HEATHER, James M. a CHAIN, Benjamin. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA., 2016. Online. *Genomics*. Roč. 107, č. 1, s. 1-8. ISSN 08887543. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>. [cit. 2024-03-16].
33. HELLWIG, Elmar; ATTIN, Thomas a KLIMEK, Joachim, 2003. *Záchovná stomatologie a parodontologie*. Praha: Grada Publishing. s. 332. ISBN 80-247-0311-4.
34. HO, John L.; SOUKIASIAN, Sarkis; OH, Won H. a SNYDMAN, David R., 1984. Hemophilus aphrophilus osteomyelitis. Online. *The American Journal of Medicine*. Roč. 76, č. 1, s. 159-161. ISSN 00029343. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(84\)90766-6](https://doi.org/10.1016/0002-9343(84)90766-6). [cit. 2024-03-16].
35. HOLT, Stanley C. a BRAMANTI, Thomas E., 1991. Factors in Virulence Expression and Their Role in Periodontal Disease Pathogenesis. Online. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. Roč. 2, č. 2, s. 177-281. ISSN 1045-4411. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/10454411910020020301>. [cit. 2024-01-31].
36. HORKÁ, Lucie, 2022. *Mikroflóra dutiny ústní*. Online, Bakalářská práce, vedoucí RNDr. Markéta Vydržalová, Ph.D. Univerzita Pardubice: Univerzita Pardubice. Dostupné z: https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/80350/HorkaL_Mikroflora_ustni_MV_2022.pdf?sequence=1&isAllowed=y. [cit. 2024-05-03].
37. CHESDACHAI, Supavit; TAI, Don Bambino Geno; YETMAR, Zachary A; MISRA, Anisha; OUGH, Natalie et al., 2021. The Characteristics of Capnocytophaga Infection: 10 Years of Experience. Online. *Open Forum Infectious Diseases*. Roč. 8, č. 7. ISSN 2328-8957. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab175>. [cit. 2023-10-03].
38. IDATE, Ulka; BHAT, Kishore; KOTRASHETTI, Vijayalakshmi; KUGAJI, Manohar a KUMBAR, Vijay, 2020. Molecular identification of Capnocytophaga species from the oral cavity of patients with chronic periodontitis and healthy individuals. Online. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. Roč. 24, č. 2. ISSN 0973-029X. Dostupné z: https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_33_20. [cit. 2024-04-19].

39. IDATE, Ulka; BHAT, Kishore; KULKARNI, Raghavendra; KUMBAR, Vijay; PATTAR, Geeta et al., 2018. Identification of Capnocytophaga species from oral cavity of healthy individuals and patients with chronic periodontitis using phenotypic tests. Online. *Journal of Advanced Clinical & Research Insights*. Roč. 5, č. 6, s. 173-177. ISSN 23938625. Dostupné z: <https://doi.org/10.15713/ins.jcri.238>. [cit. 2024-05-03].
40. ITIS - INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM. *Capnocytophaga*. Online. Dostupné z: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=956899#null. [cit. 2024-05-03].
41. ITO, Shimpei; HAGIYA, Hideharu; KIMURA, Keigo; NISHI, Isao; YOSHIDA, Hisao et al., 2016. *Capnocytophaga ochracea*-related Bacterium Bacteremia in a Hypertrophic Cardiomyopathy Patient without Neutropenia. Online. *Internal Medicine*. Roč. 55, č. 18, s. 2731-2735. ISSN 0918-2918. Dostupné z: <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.55.6593>. [cit. 2024-05-03].
42. JAKUBOVICS, Nicholas S.; GOODMAN, Steven D.; MASHBURN-WARREN, Lauren; STAFFORD, Graham P.; CIEPLIK, Fabian et al., 2021. The dental plaque biofilm matrix. Online. In: *Periodontology 2000*. Roč. 86, č. 1, s. 32-56. ISSN 0906-6713. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/prd.12361>. [cit. 2024-01-25].
43. JANDA, J. Michael., 2015. Capnocytophaga. Online. In: *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Elsevier, s. 2645-2648.e1. ISBN 9781455748013. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00235-6>. [cit. 2024-01-31].
44. JOHNSON & JOHNSON., 2015. Záněť dásní - jak ho léčit a jak mu předcházet. *StomaTeam*. Roč. 15, č. 3, s. 27-28. ISSN 1214-147X.
45. JOLIVET-GOUGEON, A. a VELLEND, Hillar, © 2010-2017. *Capnocytophaga species*. Online. Dostupné z: <http://www.antimicrobe.org/b92.asp>. [cit. 2024-05-03].
46. KALINOVÁ, Blanka, 2006. *Vesmír: Chut', smysl nejen hedonický. Kolik máme chuti?* Online. Roč. 85, č. 9. ISSN 1214-4029. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2006/cislo-9/chut-smysl-nejen-hedonicky.html>. [cit. 2024-05-03].

47. KARAHAN, Zeynep Ceren; ALTINSOY, İrem; ÇALIŞKAN, Bilge Nur; DEDE, Sıla; KAYIŞ, Görkem et al., 2023. Investigation of the presence of Capnophilic bacteria in routine urine cultures. Online. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. Roč. 42, č. 4, s. 519-524. ISSN 0934-9723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10096-023-04570-4>. [cit. 2024-03-15].
48. KITA, Daichi; SHIBATA, Satoshi; KIKUCHI, Yuichiro; KOKUBU, Eitoyo; NAKAYAMA, Koji et al., 2016 Involvement of the Type IX Secretion System in Capnocytophaga ochracea Gliding Motility and Biofilm Formation. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. Roč. 82, č. 6, s. 1756-1766. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AEM.03452-15>. [cit. 2024-02-01].
49. LAWAL, Folake J. a BAER, Stephanie L., 2021. Capnocytophaga gingivalis Bacteremia After Upper Gastrointestinal Bleeding in Immunocompromised Patient. Online. *Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports*. Roč. 9. ISSN 2324-7096. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/23247096211020672>. [cit. 2024-02-01].
50. LEADBETTER, E. R.; HOLT, S. C. a SOCRANSKY, S. S., 1979. Capnocytophaga: New genus of gram-negative gliding bacteria I. General characteristics, taxonomic considerations and significance. Online. *Archives of Microbiology*. Roč. 122, č. 1, s. 9-16. ISSN 0302-8933. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF00408040>. [cit. 2024-02-01].
51. LEE, J.C.-I.; HSIEH, H.-M. a TSAI, L.-C., 2013. DNA and Endangered Species. Online. In: *Encyclopedia of Forensic Sciences*. Elsevier, s. 409-412. ISBN 9780123821669. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00071-4>. [cit. 2024-03-22].
52. LEE, Pei Yun; COSTUMBRADO, John; HSU, Chih-Yuan a KIM, Yong Hoon, 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. Online. *Journal of Visualized Experiments*. ISSN 1940-087X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3791/3923>. [cit. 2024-03-24].
53. LEJSKOVÁ, Martina, 2023. *Typizace izolátů Capnocytophaga canimorsus vybranými mikrobiologickými technikami*. Online, Diplomová práce, vedoucí doc. Ing. David Šilha, Ph.D. Univerzita Pardubice: Univerzita Pardubice. Dostupné z: https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/81899/LejskovaM_Typizace_izolatu_DS_2023.pdf?sequence=1&isAllowed=y. [cit. 2024-05-03].

54. LIU, Lin; LI, Yinhu; LI, Siliang; HU, Ni; HE, Yimin et al., 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. Online. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Roč. 2012, s. 1-11. ISSN 1110-7243. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2012/251364>. [cit. 2024-05-03].
55. LONDON, J.; CELESK, R. A.; KAGERMEIER, A. a JOHNSON, J. L. Emended, 1985. Description of *Campylobacterium gingivalis*. Online. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Roč. 35, č. 3, s. 369-370. ISSN 0020-7713. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/00207713-35-3-369>. [cit. 2024-02-01].
56. LORENZ, Todd C., 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. Online. *Journal of Visualized Experiments*. ISSN 1940-087X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3791/3998>. [cit. 2024-02-01].
57. LYNGE PEDERSEN, Anne Marie a BELSTRØM, Daniel, 2019. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. Online. *Journal of Dentistry*. Roč. 80, s. S3-S12. ISSN 03005712. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.08.010>. [cit. 2024-01-29].
58. MAGACZ, Marcin; KĘDZIORA, Karolina; SAPA, Jacek a KRZYŚCIAK, Wirginia, 2019. The Significance of Lactoperoxidase System in Oral Health: Application and Efficacy in Oral Hygiene Products. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. Roč. 20, č. 6. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms20061443>. [cit. 2024-05-03].
59. MAHEASWARI, Rajendran; KSHIRSAGAR, JaishreeTukaram a LAVANYA, Nallasivam, 2016. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. Online. *Journal of Indian Society of Periodontology*. ISSN 0972-124X. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0972-124X.176391>. [cit. 2024-05-03].
60. MANU, Rathee a PRACHI, Jain, 2023. *Gingivitis*. Online. StatPearls Publishing. ISBN NBK557422. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32491354/>. [cit. 2024-01-12].
61. MARWAL, Avinash; SAHU, Anurag Kumar a GAUR, R.K., 2014. Molecular Markers. Online. In: *Animal Biotechnology*. Elsevier, s. 289-305. ISBN 9780124160026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00016-X>. [cit. 2024-03-26].
62. MAZÁNEK, Jiří, 2018. *Zubní lékařství: pro studující nestomatologických oborů*. Praha: Grada Publishing, a.s. s. 399. ISBN 978-80-247-5807-7.

63. MITTAL, B.; CHATURVEDI, P. a TULSYAN, S., 2013. Restriction Fragment Length Polymorphism. Online. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Elsevier, s. 190-193. ISBN 9780080961569. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01314-0>. [cit. 2024-03-22].
64. MORISHITA, Shota; FUJIWARA, Hiromitsu; MUROTA, Hiromi; MAEDA, Yumi; HARA, Ayako et al., 2013. Bloodstream infection caused by *Campylobacter lari*. Online. *Journal of Infection and Chemotherapy*. Roč. 19, č. 2, s. 333-337. ISSN 1341321X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10156-012-0471-y>. [cit. 2024-03-16].
65. MOROZOVA, Julia, 2016. Inflammatory periodontopathies. Online. *Praktické lékařství*. Roč. 12, č. 2, s. 58-61. ISSN 18012434. Dostupné z: <https://doi.org/10.36290/lek.2016.015>. [cit. 2024-05-03].
66. MURRAY, Thomas S. a CASSESE, Todd, 2016. Bacteriology of the Head and Neck Regions. Online. In: *Head, Neck, and Orofacial Infections*. Elsevier, s. 27-37. ISBN 9780323289450. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-28945-0.00002-8>. [cit. 2023-10-03].
67. MUTSCHELKNAUSS, Ralf E, 2002. Ošetření akutních onemocnění. In: MUTSCHELKNAUSS, Ralf E., Peter DIETRICH a Hans ERPENSTEIN. *Praktická parodontologie: Klinické postupy*. Praha: Quintessenz bibliothek, s. 127-133. ISBN 80-902118-8-7.
68. NANCI, Antonio a BOSSHARDT, Dieter D, 2006. Structure of periodontal tissues in health and disease. Online. *Periodontology 2000*. Roč. 40, č. 1, s. 11-28. ISSN 0906-6713. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00141.x>. [cit. 2024-01-16].
69. NG, Hong Min; KIN, Lin Xin; DASHPER, Stuart G.; SLAKESKI, Nada; BUTLER, Catherine A. et al., 2016. Bacterial interactions in pathogenic subgingival plaque. Online. *Microbial Pathogenesis*. Roč. 94, s. 60-69. ISSN 08824010. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.10.022>. [cit. 2024-01-31].
70. OCHIAI, K.; SENPUKU, H. a KURITA-OCHIAI, T, 1998. Purification of Immunosuppressive Factor from Capnocytophaga Ochracea. Online. *Journal of Medical Microbiology*. Roč. 47, č. 12, s. 1087-1095. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/00222615-47-12-1087>. [cit. 2024-02-02].

71. PAPANANOU, Panos N.; SANZ, Mariano; BUDUNELI, Nurcan; DIETRICH, Thomas; FERES, Magda et al, 2018. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. Online. *Journal of Periodontology*. Roč. 89, č. S1. ISSN 0022-3492. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721>. [cit. 2024-01-31].
72. PAREEK, Chandra Shekhar; SMOCZYNSKI, Rafal a TRETYN, Andrzej, 2011. Sequencing technologies and genome sequencing. Online. *Journal of Applied Genetics*. Roč. 52, č. 4, s. 413-435. ISSN 1234-1983. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13353-011-0057-x>. [cit. 2024-03-16].
73. PATEEL, DeepakGowda Sadashivappa; GUNJAL, Shilpa a DUTTA, Sulagna, 2022. Association of salivary statherin, calcium, and proline-rich proteins: A potential predictive marker of dental caries. Online. *Contemporary Clinical Dentistry*. Roč. 13, č. 1. ISSN 0976-237X. Dostupné z: https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_859_20. [cit. 2024-01-31].
74. PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA, 2011. *Pathogen Safety Data Sheets: Infectious Substances – Capnocytophaga spp.* Online. Government of Canada. Dostupné z: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/capnocytophaga.html>. [cit. 2024-05-03].
75. PUDAKALKATTI, PushpaS; BAHETI, AbhinavS; HATTARKI, SanjeeviniA; KAMBALI, SoumyaS a NAIK, ReshmaM, 2016. Detection and prevalence of Capnocytophaga in periodontal Health and disease. Online. *Journal of Orofacial Sciences*. Roč. 8, č. 2. ISSN 0975-8844. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0975-8844.195911>. [cit. 2024-04-19].
76. RENZI, Francesco; HESS, Estelle; DOL, Melanie; KOUDAD, Dunia; CARLIER, Elodie et al., 2018. Capsular serovars of virulent Capnocytophaga canimorsus are shared by the closely related species C. canis and C. cynodegmi. Online. *Emerging Microbes & Infections*. Roč. 7, č. 1, s. 1-12. ISSN 2222-1751. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0126-x>. [cit. 2024-05-03].
77. ROHIT, Anusha; MAITI, Biswajit; SHENOY, Shalini a KARUNASAGAR, Indrani, 2016. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for rapid diagnosis of neonatal sepsis. Online. *Indian Journal of Medical Research*. Roč. 143, č. 1. ISSN 0971-5916. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0971-5916.178613>. [cit. 2024-03-23].

78. ROSENBAUM, Filip, 2015. Onemocnění dásní od gingivitidy k parodontitidě. *Pharma News*. Online. Praha: Pharma News. Dostupné z: <https://www.pharmanews.cz/clanek/onemocneni-dasni-od-gingivitidy-k-parodontitide/>. [cit. 2022-03-29].
79. SAHUQUILLO-ARCE, J.M.; CHOUMAN-ARCAS, R.; MOLINA-MORENO, J.M.; HERNÁNDEZ-CABEZAS, A.; FRASQUET-ARTÉS, J. et al., 2017. Capnophilic Enterobacteriaceae. Online. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Roč. 87, č. 4, s. 318-319. ISSN 07328893. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.010>. [cit. 2024-03-16].
80. SAMPAIO-MAIA, B.; CALDAS, I.M.; PEREIRA, M.L.; PÉREZ-MONGIOVI, D. a ARAUJO, R., 2016. The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. Online. In: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, s. 171-210. ISBN 9780128048160. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.08.002>. [cit. 2024-05-04].
81. SANTACROCE, Luigi; PASSARELLI, Pier Carmine; AZZOLINO, Domenico; BOTTALICO, Lucrezia; CHARITOS, Ioannis Alexandros et al., 2023. Oral microbiota in human health and disease: A perspective. Online. *Experimental Biology and Medicine*. Roč. 248, č. 15, s. 1288-1301. ISSN 1535-3702. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/15353702231187645>. [cit. 2024-01-24].
82. SANTILLAN, Eugenio-Felipe U.; SHANAHAN, Timothy M.; OMELOM, Christopher R.; MAJOR, Jonathan R. a BENNETT, Philip C., 2015. Isolation and characterization of a CO₂-tolerant Lactobacillus strain from Crystal Geyser, Utah, U.S.A. Online. *Frontiers in Earth Science*. Roč. 3. ISSN 2296-6463. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/feart.2015.00041>. [cit. 2024-03-15].
83. SHIGEISHI, Hideo; HAMADA, Natsuki; KANEYASU, Yoshino; NIITANI, Yoshie; TAKEMOTO, Toshinobu et al., 2024. Prevalence of oral Capnocytophaga species and their association with dental plaque accumulation and periodontal inflammation in middle-aged and older people. Online. *Biomedical Reports*. 2024-04-30, roč. 20, č. 6. ISSN 2049-9434. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/br.2024.1787>. [cit. 2024-05-08].

84. SHURIN, Susan B.; SOCRANSKY, Sigmund S.; SWEENEY, Edward a STOSSEL, Thomas P., 1979. A Neutrophil Disorder Induced by Capnocytophaga, a Dental Micro-Organism. Online. *New England Journal of Medicine*. Roč. 301, č. 16, s. 849-854. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <https://doi.org/10.1056/NEJM197910183011601>. [cit. 2024-02-02].
85. SCHADT, E. E.; TURNER, S. a KASARSKIS, A., 2010. A window into third-generation sequencing. Online. *Human Molecular Genetics*. Roč. 19, č. R2, s. R227-R240. ISSN 0964-6906. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq416>. [cit. 2024-03-16].
86. SLEZÁK, Radovan, Ivo DŘÍZHAL, Jiří HORÁČEK a Otakar KOPECKÝ, 1997. *Infekční choroby ústní sliznice*. Praha: Grada Publishing, spol s r. o. s. 180. ISBN 80-7169-221-2.
87. SLEZÁKOVÁ, Lenka, 2016. *Stomatologie I: pro SZŠ a VOŠ*. Praha: Grada Publishing, s. 264. ISBN 978-80-271-9359-2.
88. STRAKA, Michal, 2016. Etiopatogeneze parodontitid a jejich vztah k systémovým onemocněním. Praha: *StomaTeam*. s. 166. ISBN 978-80-904377-3-9.
89. SUN, Jinchun; JIN, Jinshan; BEGER, Richard D.; CERNIGLIA, Carl E.; YANG, Maocheng et al., 2016. Metabolomics evaluation of the impact of smokeless tobacco exposure on the oral bacterium *Capnocytophaga sputigena*. Online. *Toxicology in Vitro*. Roč. 36, s. 133-141. ISSN 08872333. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.07.020>. [cit. 2024-05-03].
90. SUZUKI, Michio; KIMURA, Masanobu; IMAOKA, Koichi a YAMADA, Akio, 2010. Prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* in dogs and cats determined by using a newly established species-specific PCR. Online. *Veterinary Microbiology*. Roč. 144, č. 1-2, s. 172-176. ISSN 03781135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.01.001>. [cit. 2024-05-03].
91. TSUCHIDA, Sachio; UMEMURA, Hiroshi a NAKAYAMA, Tomohiro, 2020. Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. Online. *Molecules*. Roč. 25, č. 20. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules25204775>. [cit. 2024-05-03].
92. UEDA, Kenji; TAGAMI, Yudai; KAMIHARA, Yuka; SHIRATORI, Hatsumi; TAKANO, Hideaki et al., 2008. Isolation of Bacteria Whose Growth Is Dependent on High Levels of CO₂ and Implications of Their Potential Diversity. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008-07-15, roč. 74, č. 14, s. 4535-4538. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AEM.00491-08>. [cit. 2024-05-02].

93. VAN DYKE, T. E.; BARTHOLOMEW, E.; GENCO, R. J.; SLOTS, J. a LEVINE, M. J., 1982. Inhibition of Neutrophil Chemotaxis by Soluble Bacterial Products. Online. *Journal of Periodontology*. Roč. 53, č. 8, s. 502-508. ISSN 0022-3492. Dostupné z: <https://doi.org/10.1902/jop.1982.53.8.502>. [cit. 2024-05-02].
94. VAN WINKELHOFF, A.J.; BOSCH-TIJHOF, C.J.; WINKEL, E.G. a VAN DER REIJDEN, W.A., 2001. Smoking Affects the Subgingival Microflora in Periodontitis. Online. *Journal of Periodontology*. Roč. 72, č. 5, s. 666-671. ISSN 0022-3492. Dostupné z: <https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.5.666>. [cit. 2024-05-02].
95. VILÍMOVSKÝ, Michal, 2019. Jazyk: anatomie, histologie a funkce. *Medlicker*. Online. *Medlicker*, Zruč nad Sázavou. Dostupné z: <https://cs.medlicker.com/10-jazyk-anatomie-histologie-a-funkce> [cit. 2022-03-28].
96. VOTAVA, Miroslav; BROUKAL, Zdeněk a VANĚK, Jiří, 2007. *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékaře*. Brno: Neptun. s. 566. ISBN 978-80-86850-03-0.
97. WEBER, Thomas, 2012. *Memorix zubního lékařství*. 3. zcela přepracované a rozšířené vyd. Přeložil Magdalena KOŤOVÁ. Praha: Grada Publishing, a.s., s. 584. ISBN 978-80-247-3519-1.
98. WU, Jiayi; LI, Mingyun a HUANG, Ruijie, 2019. The effect of smoking on caries-related microorganisms. Online. *Tobacco Induced Diseases*. Roč. 17, č. April. ISSN 1617-9625. Dostupné z: <https://doi.org/10.18332/tid/105913>. [cit. 2024-03-22].
99. YAMAMOTO, T.; KAJIURA, S.; HIRAI, Y. a WATANABE, T., 1994. *Capnocytophaga haemolytica* sp. nov. and *Capnocytophaga granulosa* sp. nov., from Human Dental Plaque. Online. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1994-04-01, roč. 44, č. 2, s. 324-329. ISSN 0020-7713. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/00207713-44-2-324>. [cit. 2024-05-02].
100. ZOULOVÁ, Andrea, 2012. Kuřák v péči dentální hygienistky. *StomaTeam*. Roč. 12, č. 5, s. 49-54. ISSN 1214-147X.

6 ZDROJE ILUSTRACÍ

1. WEBER, Thomas. *Memorix zubního lékařství*. Překlad 3., zcela přepracované a rozšířené vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2012. s. 584. ISBN 978-80-247-3519-1.
2. UNIVERSITY MEDICAL CENTER ROTTERDAM, 2020. *Capnocytophaga gingivalis*. Online. In: *Microbe Canvas*. Dostupné z: <https://microbe-canvas.com/Bacteria/gram-negative-rods/facultative-anaerobic-3/no-growth-on-mcconkey-agar-without-salt-1/catalase-negative-3/oxidase-negative-5/capnocytophaga-gingivalis.html>. [cit. 2024-02-02].
3. YAMAMOTO, T.; KAJIURA, S.; HIRAI, Y. a WATANABE, T., 1994. *Capnocytophaga haemolytica* sp. nov. and *Capnocytophaga granulosa* sp. nov., from Human Dental Plaque. Online. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Roč. 44, č. 2, s. 324-329. ISSN 0020-7713. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/00207713-44-2-324>. [cit. 2024-04-19]
4. YAMAMOTO, T.; KAJIURA, S.; HIRAI, Y. a WATANABE, T., 1994. *Capnocytophaga haemolytica* sp. nov. and *Capnocytophaga granulosa* sp. nov., from Human Dental Plaque. Online. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Roč. 44, č. 2, s. 324-329. ISSN 0020-7713. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/00207713-44-2-324>. [cit. 2024-04-19].
5. YAMAMOTO, T.; KAJIURA, S.; HIRAI, Y. a WATANABE, T., 1994. *Capnocytophaga haemolytica* sp. nov. and *Capnocytophaga granulosa* sp. nov., from Human Dental Plaque. Online. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1994, roč. 44, č. 2, s. 324-329. ISSN 0020-7713. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/00207713-44-2-324>. [cit. 2024-04-19].
6. UNIVERSITY MEDICAL CENTER ROTTERDAM, 2020. *Capnocytophaga sputigena*. In: *Microbe Canvas*. Dostupné z: <https://microbe-canvas.com/Bacteria/gram-negative-rods/facultative-anaerobic-3/no-growth-on-mcconkey-agar-without-salt-1/catalase-negative-3/oxidase-negative-5/capnocytophaga-sputigena.html>. [cit. 2024-02-02].

7. GREEN, Michael R. a SAMBROOK, Joseph, 2019. Polymerase Chain Reaction. Online. *Cold Spring Harbor Protocols*. Roč. 2019, č. 6. ISSN 1940-3402. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>. [cit. 2024-02-01].
8. FERNÁNDEZ VECILLA, Domingo; UGALDE ZARRAGA, Estíbaliz; URRUTIKOECHEA-GUTIÉRREZ, Mikel Joseba; RENZI, Francesco a DÍAZ DE TUESTA DEL ARCO, José Luis, 2022. Cellulitis and transient bacteremia by *Capnocytophaga canis* after a cat scratch in an immunocompetent patient. Online. *Access Microbiology*. 2022-05-18, roč. 4, č. 5. ISSN 2516-8290. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000352>. [cit. 2024-05-07].
9. Schéma aparatury pro agarózovou elektroforézu. Postup při separaci v agarosovém gelu. Obrázek; online. In: *LabGuide – Průvodce laboratoří*. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/elektroforeticka-separace-nukleovych-kyseliny/elfo-v-agarosovem-gelu/>. [cit. 2024-04-19].
10. MARWAL, Avinash; SAHU, Anurag Kumar a GAUR, R.K., 2014. Molecular Markers. Online. In: *Animal Biotechnology*. Elsevier, s. 289-305. ISBN 9780124160026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00016-X>. [cit. 2024-03-26].
11. Fotografie naočkovaných referenčních kmenů. Fotografie z archivu autora
12. Fotografie ref. kmenu *C. gingivalis* pomocí Gramova barvení. Fotografie z archivu autora
13. Fotografie ref. kmenu *C. ochracea* pomocí Gramova barvení. Fotografie z archivu autora
14. Fotografie ref. kmenu *C. sputigena* pomocí Gramova barvení. Fotografie z archivu autora
15. KA-G vzorku č. 51. Fotografie z archivu autora
16. Mikroskopický průkaz přítomnosti *Capnocytophaga* pomocí Gramova barvení. Fotografie z archivu autora
17. Snímek z gelové elektroforézy na průkaz přítomnosti *C. ochracea*. Fotografie z archivu autora

7 PŘÍLOHA

Příloha A <i>Dotazník pro průzkum povědomí veřejnosti o orálním zdraví</i>	118
--	-----

Příloha A – Dotazník

Dobrý den,

jmenuji se Lucie Horká a jsem studentkou oboru Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví. Tímto bych Vás chtěla poprosit o vyplnění tohoto krátkého dotazníku, který poslouží jako podklad pro vypracování mé diplomové práce. Předem Vám děkuji za Váš čas. S pozdravem,

Lucie Horká

- 1) Do jaké věkové kategorie se řadíte?
 - Méně než 18
 - 18-30
 - 31-40
 - 41-50
 - 51 a více

- 2) Jaké je Vaše pohlaví?
 - Muž
 - Žena

- 3) Jak často provádíte hygienu dutiny ústní?
 - 3x denně každý den
 - 2x denně každý den
 - 1x denně
 - Po každém jídle
 - Neprovádím

- 4) Jaké využíváte pomůcky pro udržení čistoty dutiny ústní? *Je možno vícero odpovědí. Pokud zvolíte možnost Jiné, uveďte:*
 - Pouze zubní kartáček
 - Zubní kartáček a mezizubní kartáček/kartáčky
 - Zubní kartáček, mezizubní kartáček/kartáčky, jednosvazkový kartáček
 - Zubní kartáček, mezizubní kartáček/kartáčky, dentální nit
 - Zubní kartáček, mezizubní kartáček/kartáčky, dentální nit, ústní sprchu
 - Pouze ústní sprchu
 - Jiné:

- 5) Zaměřujete se při orální hygieně také na důkladné vyčištění dásňových žlábků?
 - Ano
 - Ne

- 6) Řadíte se mezi aktivní kuřáky/kuřačky?
- Ano
 - Ne
- 7) Setkali jste se již někdy s pojmem gingivitida?
- Ano
 - Ne
- 8) Setkali jste se již někdy s pojmem parodontitida, resp. parodontóza?
- Ano
 - Ne
- 9) Věděli byste, jaký je mezi nimi rozdíl? *Pokud ano, uveďte*
- Ano
 - Ne
 - Nejsem si úplně jistý/jistá, co přesně znamenají
 -
- 10) Měli jste někdy s těmito onemocněními problémy? *V případě, že jste v předchozích otázkách č. 7, 8 a 9 opověděli NE, neodpovídáte*
- Ano
 - Ne
- 11) Vyskytují se u Vás v současné době zduřelé a červeně zbarvené dásně?
- Ano
 - Ne
- 12) Dochází u Vás k častému krvácení dásní? Plivete při čištění zubů krev?
- Ano
 - Ne
 - Někdy ano
- 13) Pociťujete u sebe častý výskyt zápachu z úst?
- Ano
 - Ne
- 14) Vyskytují se u Vás občasné pocity suchosti v ústech?
- Ano
 - Ne
- 15) Pozorujete u sebe zvýšenou citlivost zubů?
- Ano
 - Ne

16) Navštívil/Navštívila jste již někdy dentální hygienu?

- Ano
- Ne

17) S jakou četností ji navštěvujete?

- 1x za rok
- 2x za rok
- Nenavštěvuji