

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Tvorba biofilmu u anaerobních bakterií

Anna Doubravová

Bakalářská práce
2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně s využitím literárních pramenů a informací, které jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47 b 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. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 29. 6. 2018

Anna Doubravová

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování bakalářské práce.

Obrovské díky za podporu po celou dobu studia patří i mé rodině, přátelům a mému partnerovi.

ANOTACE

Tato bakalářská práce byla věnována nejčastějším anaerobním bakteriím vyskytujícím se v ranách a jejich možnou tvorbou biofilmu. Dále byla v bakalářské práci objasněna jejich možná citlivost na antibiotika, detekce a identifikace.

KLÍČOVÁ SLOVA

anaerobní bakterie, biofilm, identifikace, mikrobiologie, antibiotika, virulence, patogenita

SUMMARY

This bachelor thesis is about the most frequent anaerobic bacteria which we can find in the wound and a possibility of the production of the biofilm there. Another part of this thesis is consist of the sensitivity to antibiotics, detection and identification of the bacteria in the wound.

KEYWORDS

anaerobic bacteria, biofilm, identification, microbiology, antibiotics, virulence, pathogenicity

OBSAH

Seznam obrázků	11
Seznam tabulek	12
Seznam použitých zkratek	13
ÚVOD	15
1 Anaerobní bakterie	16
1.1 Charakteristika anaerobních bakterií	16
1.2 Gramnegativní anaerobní tyčinky a vlákna	17
1.2.1 Rod <i>Fusobacterium</i>	17
1.2.1.1 Mikrobiologická charakteristika rodu <i>Fusobacterium</i>	17
1.2.1.2 Patogenita a virulence rodu <i>Fusobacterium</i>	17
1.2.1.3 Detekce rodu <i>Fusobacterium</i>	18
1.2.1.4 Identifikace rodu <i>Fusobacterium</i>	18
1.2.1.5 Citlivost na ATB rodu <i>Fusobacterium</i>	19
1.2.1.6 Tvorba biofilmu rodu <i>Fusobacterium</i>	19
1.2.2 Rod <i>Bacteroides</i>	19
1.2.2.1 Mikrobiologická charakteristika rodu <i>Bacteroides</i>	19
1.2.2.2 Patogenita a virulence rodu <i>Bacteroides</i>	20
1.2.2.3 Detekce rodu <i>Bacteroides</i>	20
1.2.2.4 Identifikace rodu <i>Bacteroides</i>	21
1.2.2.5 Citlivost na ATB rodu <i>Bacteroides</i>	22
1.2.3 Rod <i>Prevotella</i>	22
1.2.3.1 Mikrobiologická charakteristika rodu <i>Prevotella</i>	22
1.2.3.2 Patogenita a virulence rodu <i>Prevotella</i>	22
1.2.3.3 Detekce rodu <i>Prevotella</i>	23
1.2.3.4 Identifikace rodu <i>Prevotella</i>	23
1.2.3.5 Citlivost na ATB rodu <i>Prevotella</i>	23
1.2.3.6 Tvorba biofilmu rodu <i>Prevotella</i>	23
1.2.4 Rod <i>Porphyromonas</i>	24
1.2.4.1 Mikrobiologická charakteristika rodu <i>Porphyromonas</i>	24
1.2.4.2 Patogenita a virulence rodu <i>Porphyromonas</i>	24
1.2.4.3 Detekce rodu <i>Porphyromonas</i>	27
1.2.4.4 Identifikace rodu <i>Porphyromonas</i>	27
1.2.4.5 Citlivost na ATB rodu <i>Porphyromonas</i>	28

1.2.4.6	Tvorba biofilmu rodu <i>Porphyromonas</i>	29
1.2.5	Rod <i>Bilophila</i>	29
1.2.5.1	Mikrobiologická charakteristika rodu <i>Bilophila</i>	29
1.2.5.2	Patogenita a virulence rodu <i>Bilophila</i>	29
1.2.5.3	Detekce rodu <i>Bilophila</i>	30
1.2.5.4	Identifikace rodu <i>Bilophila</i>	30
1.2.5.5	Citlivost na ATB rodu <i>Bilophila</i>	30
1.2.6	Rod <i>Mobiluncus</i>	30
1.2.6.1	Mikrobiologická charakteristika rodu <i>Mobiluncus</i>	30
1.2.6.2	Patogenita a virulence rodu <i>Mobiluncus</i>	31
1.2.6.3	Detekce a identifikace rodu <i>Mobiluncus</i>	31
1.2.6.4	Citlivost na ATB rodu <i>Mobiluncus</i>	31
1.2.6.5	Tvorba biofilmu rodu <i>Mobiluncus</i>	31
1.3	Gramnegativní anaerobní koky	32
1.3.1	Rod <i>Veillonella</i>	32
1.3.1.1	Mikrobiologická charakteristika rodu <i>Veillonella</i>	32
1.3.1.2	Patogenita a virulence rodu <i>Veillonella</i>	32
1.3.1.3	Detekce rodu <i>Veillonella</i>	32
1.3.1.4	Identifikace rodu <i>Veillonella</i>	32
1.3.1.5	Citlivost na ATB rodu <i>Veillonella</i>	33
1.3.1.6	Tvorba biofilmu rodu <i>Veillonella</i>	33
1.4	Grampozitivní anaerobní sporující tyčinky.....	33
1.4.1	<i>Clostridium difficile</i>	33
1.4.1.1	Mikrobiologická charakteristika <i>Clostridium difficile</i>	33
1.4.1.2	Patogenita a virulence <i>Clostridium difficile</i>	33
1.4.1.3	Detekce <i>Clostridium difficile</i>	35
1.4.1.4	Identifikace <i>Clostridium difficile</i>	35
1.4.1.5	Citlivost na ATB <i>Clostridium difficile</i>	36
1.4.1.6	Tvorba biofilmu <i>Clostridium difficile</i>	36
1.4.2	<i>Clostridium botulinum</i>	37
1.4.2.1	Mikrobiologická charakteristika <i>Clostridium botulinum</i>	37
1.4.2.2	Patogenita a virulence <i>Clostridium botulinum</i>	37
1.4.2.3	Detekce <i>Clostridium botulinum</i>	38
1.4.2.4	Identifikace <i>Clostridium botulinum</i>	38
1.4.2.5	Citlivost na ATB <i>Clostridium botulinum</i>	38

1.4.3 <i>Clostridium tetani</i>	39
1.4.3.1 Mikrobiologická charakteristika <i>Clostridium tetani</i>	39
1.4.3.2 Patogenita a virulence <i>Clostridium tetani</i>	39
1.4.3.3 Detekce <i>Clostridium tetani</i>	39
1.4.3.4 Identifikace <i>Clostridium tetani</i>	39
1.4.3.5 Citlivost na ATB <i>Clostridium tetani</i>	39
1.4.4 <i>Clostridium perfringens</i>	40
1.4.4.1 Mikrobiologická charakteristika <i>Clostridium perfringens</i>	40
1.4.4.2 Patogenita a virulence <i>Clostridium perfringens</i>	40
1.4.4.3 Detekce <i>Clostridium perfringens</i>	40
1.4.4.4 Identifikace <i>Clostridium perfringens</i>	41
1.4.4.5 Citlivost na ATB <i>Clostridium perfringens</i>	42
1.4.5 <i>Clostridium septicum</i>	42
1.4.5.1 Mikrobiologická charakteristika <i>Clostridium septicum</i>	42
1.4.5.2 Patogenita a virulence <i>Clostridium septicum</i>	42
1.4.5.3 Detekce <i>Clostridium septicum</i>	42
1.4.5.4 Identifikace <i>Clostridium septicum</i>	42
1.4.5.5 Citlivost na ATB <i>Clostridium septicum</i>	43
1.4.6 <i>Clostridium histolyticum</i> , <i>Clostridium sordellii</i> , <i>Clostridium sporogenes</i>	43
1.5 Grampozitivní anaerobní nesporulující tyčinky	43
1.5.1 Rod <i>Actinomyces</i>	43
1.5.1.1 Mikrobiologická charakteristika rodu <i>Actinomyces</i>	43
1.5.1.2 Patogenita a virulence rodu <i>Actinomyces</i>	44
1.5.1.3 Detekce rodu <i>Actinomyces</i>	44
1.5.1.4 Identifikace rodu <i>Actinomyces</i>	44
1.5.1.5 Citlivost na ATB rodu <i>Actinomyces</i>	44
1.5.1.6 Tvorba biofilmu rodu <i>Actinomyces</i>	44
1.5.2 Rod <i>Propionibacterium</i>	45
1.5.2.1 Mikrobiologická charakteristika rodu <i>Propionibacterium</i>	45
1.5.2.2 Patogenita a virulence rodu <i>Propionibacterium</i>	45
1.5.2.3 Detekce rodu <i>Propionibacterium</i>	46
1.5.2.4 Identifikace rodu <i>Propionibacterium</i>	46
1.5.2.5 Citlivost na ATB rodu <i>Propionibacterium</i>	46
1.5.2.6 Tvorba biofilmu rodu <i>Propionibacterium</i>	46

1.6 Grampozitivní anaerobní koky.....	47
1.6.1 Rod <i>Peptostreptococcus</i>	47
1.6.1.1 Mikrobiologická charakteristika rodu <i>Peptostreptococcus</i>	47
1.6.1.2 Patogenita a virulence rodu <i>Peptostreptococcus</i>	47
1.6.1.3 Detekce rodu <i>Peptostreptococcus</i>	47
1.6.1.4 Identifikace rodu <i>Peptostreptococcus</i>	48
1.6.1.5 Citlivost na ATB rodu <i>Peptostreptococcus</i>	48
2 Biofilm.....	49
2.1 Definice biofilmu	49
2.3 Výhody přežívání bakterií v biofilmu	50
2.4 Nález biofilmu v lidském organismu	51
2.5 Nejčastější biofilmové infekce a jejich původci	52
2.6 Anaerobní druhy bakterií spojené se vznikem infekcí	53
ZÁVĚR.....	55
Seznam použité literatury	56

Seznam obrázků

Obrázek 1 Vzhled <i>Bacteroides fragilis</i>	21
Obrázek 2 Kultivace <i>P. gingivalis</i>	24
Obrázek 3 Test na rychlou detekci mikroorganismu řady RapID.	28
Obrázek 4 CDI infekce.	35
Obrázek 5 Průkaz lecitinázy <i>C. perfringens</i> na Mueller-Hintonově agaru	41
Obrázek 6 Bakteriální biofilm.	49
Obrázek 7 Cesty vstupu infekce do těla.	52

Seznam tabulek

Tabulka 1 Faktory virulence a hostitelské efekty rodu <i>Porphyromonas gingivalis</i>	26
Tabulka 2 Infekce, jejichž příčinou je <i>Propionibacterium acnes</i>	45
Tabulka 3 Biofilmová onemocnění	53

Seznam použitých zkratek

ABB	Anaerobe Basal Broth – živný agar obsahující řadu peptonů pro anaerobní bakterie
ACP	Acid Phosphatase – kyselá fosfatáza
<i>Agg. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
ALP	Alkaline Phosphatase – alkalická fosfatáza
ATB	Antibiotics – antibiotika
<i>B. fragilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
BANA	N-benzoyl-DL-arginin-2-naftylamid
BHI	Brain Heart Infusion – agar z infuze mozkové a srdeční tkáně
BoNT	Botulinum Neurotoxins – komplex botulinového neurotoxinu
BSM	Bifidus Selective Medium – selektivní médium pro bifidobakterie
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
CDI	<i>Clostridium difficile</i> Infection – infekce způsobená <i>C. difficile</i>
CFU	Colony Forming Units – kolonie tvořící jednotku
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole-fluorescenční metoda využívající 4',6-diamino-2-fenylindol
ECM	Extracelulární matrix
eDNA	Extracellular DNA – extracelulární DNA
EIA	Enzyme Immuno Assay – enzymová imunoanalýza
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – imunologická metoda sloužící k detekci a stanovení koncentrace antigenů a protilátek
EPS	Extracelulární Polymerní Substance
EYA	Egg Yolk Agar – agar s vaječnou emulzí
<i>F. fundliforme</i>	<i>Fusobacterium fundliforme</i>
<i>F. necrophorum</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>

FISH	Fluorescence In Situ Hybridization – cytogenetická metod
FMT	Fecal Microbiota Transplant – transplantace fekální mikroflóry
IUDs	Intrauterine Devices – nitroděložní tělíská
LPS	Lipopolysacharid
<i>M. mulieris</i>	<i>Mobiluncus mulieris</i>
MALDI-TOF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průtokovým analyzátozem
MIC	Minimum inhibitory concentration – minimální inhibiční koncentrace
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P. nigrescens</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction – polymerázová řetězová reakce
<i>Pep. anaerobius</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Pep. magnus</i>	<i>Peptostreptococcus magnus</i>
<i>Pep. micros</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
<i>Pep. stomatis</i>	<i>Peptostreptococcus stomatis</i>
PMMA	Polymethylmetakrylát
<i>Por. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Prop. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
rRNA	ribosomální RNA
UV	Ultraviolet light – ultrafialové záření

ÚVOD

Anaerobní mikroorganismy patří mezi běžnou součást mikrobiální flóry člověka i zvířat. Problém nastává při porušení kožní nebo slizniční bariéry, kdy se bakterie dostávají do rány a mohou v anaerobním prostředí vyvolat hnisavý nekrotizující zánět. Tyto mikroorganismy jsou nejčastěji endogenního původu a dostávají se do rány při zhmoždění ischemické tkáně, cizími tělesy nebo při nekrotázách. U těchto mikrobů je patogenita různá. Může se jednat o neškodné komenzály či velmi nebezpečné a život ohrožující druhy.

Mezi další komplikace, související s anaerobními mikroorganismy, řadíme tvorbu biofilmu ve vzniklé ráně. Biofilm u patogenních a oportunně patogenních mikroorganismů je jeden z největších problémů zejména v lékařství. Tyto biofilmy jsou spojené s vysokou rezistencí u vznikajících chronických a obtížně léčitelných infekcí.

V bakalářské práci se budu zabývat nejčastějším infekcím způsobeným anaerobními mikroorganismy, jejich detekcí a identifikací, která je založena na metodách kultivace mikroorganismů a provedení biochemických testů. Dále jsou využívány modernější, rychlejší a citlivější metody jako např. PCR či ELISA metoda. Ve vytiženějších laboratořích poté nalézáme druhovou identifikaci mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI – TOF MS. U každého mikroorganismu je také uvedena citlivost na antibiotika, která souvisí s jeho identifikací a léčbou. Indikování vhodné a účinné léčby antibiotiky je stěžováno nově vznikající rezistencí u mikroorganismů. Proto jsou vyvíjeny nové metody léčby a nová složení ATB.

1 Anaerobní bakterie

Anaerobní bakterie nacházíme stejně jako bakterie aerobní všude kolem nás. Některé jsou důležitou součástí lidské mikroflóry, jiné zase hrají roli ve fyziologii hostitele. Jako společné znaky pro všechny anaerobní mikroorganismy označujeme nízké hodnoty oxidačně-redukčního potenciálu, nepřítomnost enzymů oxidativního metabolismu (katalázy, peroxidázy a superoxid – dismutázy). Anaerobní bakterie také uvolňují zapáchající produkty do svého okolí (Csolleyová a kol., 2017).

1.1 Charakteristika anaerobních bakterií

Anaeroby lze řadit do skupiny různorodých mikroorganismů, která zahrnuje grampozitivní i gramnegativní bakterie různého tvaru. Anaerobní mikroorganismy dělíme na sporulující a nesporulující.

Do skupiny nesporulujících gramnegativních anaerobů řadíme rody *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* a *Fusobacterium*, které způsobují více než 43 % všech anaerobních infekcí. Zatímco grampozitivní anaerobní tyčinky, kam patří rod *Actinomyces*, jsou součástí běžné slizniční nebo kožní mikroflóry a izolujeme je při smíšených anaerobních infekcích (Csolleyová a kol., 2017).

Sporulující anaerobní mikroorganismy tvoří spory, které jsou velice odolné proti nepříznivým podmínkám. Řadíme sem rod *Clostridium* spp. Tyto mikroorganismy se vyskytují hlavně v půdě, prachu a ve střevním traktu. Mezi příčiny, pro které je typický vznik infekce, spadají úrazy po dopravních nehodách nebo úrazy v zemědělství. Mohou se vyskytovat i jako endogenní infekce při operacích trávicího traktu (Csolleyová a kol., 2017).

Patogenní anaerobní mikroorganismy potřebují vytvořit anaerobní mikroprostředí nebo být schopny tolerovat expozici kyslíku. V prvním případě dokáží bakterie vytvořit anaerobní mikroprostředí aktivitou faktorů virulence jako je endotoxin, hemolysin nebo agregační faktor trombocytů. Mezi další možnosti vytvoření anaerobního mikroprostředí řadíme soužití s aerobními nebo fakultativně aerobními bakteriemi, které kyslík zkonsumují. Kyslíková tolerance umožňuje anaerobům přežít v infikovaných tkáních, dokud nejsou podmínky vhodné pro jejich množení a invazi. Procesy, mezi které patří adherence, kolonizace, invaze a destrukce tkáně, bývají usnadňovány bakteriálními strukturami, jako jsou pily, aglutininy, adheziny, lipopolysacharidy (LPS) a proteiny vnější membrány (exotoxiny, enterotoxiny a hemolysin). Podílejí se i extracelulární enzymy, jako je neuraminidáza, proteázy, DNAázy a lipázy. Degradaci tkáně způsobuje hostitelská imunitní odpověď a zánět, které jsou

vyvolány specifickými bakteriálními produkty uvolňujícími široké spektrum inflamatorních cytokinů, chemokinů a dalších mediátorů. Zánětlivý a cytotoxický účinek mají produkty fermentace (kyselina mléčná a kyselina máselná), které vytvářejí charakteristický zápach anaerobní infekce (Gyles, 2010).

1.2 Gramnegativní anaerobní tyčinky a vlákna

Většina těchto mikroorganismů je součástí běžné mikroflóry lidského těla, hlavně močové trubice, nosohltanu, vagíny či nižších etází zažívacího traktu. Některé z nich se příležitostně vyskytují jako původci endogenní infekce, a to obvykle ve směsi s jinými anaerobními nebo i aerobními mikroorganismy. Netvoří spory (Votava a kol., 2003).

1.2.1 Rod *Fusobacterium*

1.2.1.1 Mikrobiologická charakteristika rodu *Fusobacterium*

Rod *Fusobacterium* řadíme do čeledi *Fusobacteriaceae* (NCBI, Taxonomy Browser, [b.r.]). Do tohoto rodu spadá velký počet druhů. Bakterie rodu *Fusobacterium* jsou velice polymorfní a často mívají podobu vlákn. Tato vlákna bývají uprostřed zduřelá a mají špičaté konce. Hlavní produkt metabolismu je kyselina máselná. Bakterie rodu *Fusobacterium* lze najít v horních dýchacích cestách, gastrointestinálním traktu nebo ve vagíně jako součást běžné mikroflóry (Votava a kol., 2003).

1.2.1.2 Patogenita a virulence rodu *Fusobacterium*

Mezi nejčastější původce infekce, které se mohou vyskytovat u lidí a způsobovat vážné komplikace, řadíme *F. nucleatum* a *F. necrophorum* (Roberts, 2000).

Bakterie rodu *F. nucleatum* využívají k tvorbě energie katabolismus aminokyselin a některé kmeny dokonce vyžadují růstové peptidy. Glukóza pro ně není tolik potřebná, jako bývá pozorováno u jiných mikroorganismů. Hlavním produktem je kyselina máselná, kterou nacházíme u metabolismu peptonu či sacharidů. Inhibici proliferace lidských gingiválních fibroblastů způsobuje butyrát. Ten také proniká do gingiválního epitelu a může být ve zvýšené míře v periodontálním plaku. Jako další faktor můžeme uvést proteázy, které se podílejí na destrukci periodontu aktivací lidských prokolagenáz. Cytokiny rozpouští nemineralizované pojivové tkáně. Časná imunitní dysfunkce přispívá ke zvýšené náchylnosti periodontálního onemocnění. Pro bakterie je velice důležitá i adherence neboli přilnavost buněk, která je nezbytná při kolonizaci a vzniku infekce. Adheziny, obsahující lektiny a proteiny vnější membrány, jsou na povrchu bakteriální buňky a rozpoznávají komplexní polysacharidy jiných bakterií. Lipopolysacharidy mají schopnost adherence k lidským zubům, ale také na polymorfní neutrofile, kde vyvolávají uvolňování reaktivních forem kyslíku.

V periodontální kapse žijí v symbióze s *P. gingivalis* a vzájemně se zásobují esenciálními metabolity (Roberts, 2000).

F. necrophorum je další mikroorganismus způsobující infekce. Dělíme jej do poddruhů *F. necrophorum* a *F. fundliforme*. Tyto poddruhy jsou také označovány jako biovar A a biovar B. Biovar A způsobuje závažná onemocnění u skotu, zatímco biovar B je hlavní patogen člověka. Při testování virulence obou biovarů byla prokázána vyšší virulence u biovaru A (Brazier, 2006). Faktory virulence tvoří leukotoxin, endotoxický lipopolysacharid, hemolysin, hemaglutininy, adheziny nebo pily, faktor agregace destiček, dermonekrotický faktor, spousty extracelulárních enzymů zahrnujících proteázy a deoxyribonukleázy. Všechny tyto faktory potřebuje mikroorganismus k adhezi, vstupu do hostitele, kolonizaci a proliferaci uvnitř hostitele (Nagaraja et al., 2005).

1.2.1.3 Detekce rodu *Fusobacterium*

Jelikož jsou všechny druhy rodu *Fusobacterium* spp. anaerobní, je jejich detekce a identifikace náročnější. Cílem proto bylo vyvinout analýzu molekulární PCR založenou na 16S ribozomální DNA (rDNA). Tento druh DNA je specifický pro fusobakterie a jeho výhodou je flexibilita pro detekci a následnou identifikaci druhů v tomto rodu prostřednictvím pozitivních PCR amplikonů. Analýza umožnila identifikaci dvou primerových oblastí na genu lokusu 16S rDNA, který měl 100% homologii se všemi druhy rodu *Fusobacterium* spp., ale částečná shoda byla i u jiných rodů. Proto byla detekce fusobakterií zesílena pomocí páru primerů FUSO1 a FUSO2. Následně byla prokázána schopnost tohoto rodu produkovat PCR amplikony o předpokládané velikosti. Tento genospecifický test je jednoduchý a lze ho použít pro detekci rodu *Fusobacterium* spp. z klinických vzorků (Nagano et al., 2007).

1.2.1.4 Identifikace rodu *Fusobacterium*

Identifikace *F. necrophorum* je založena na morfologii kolonií, zápachu kyseliny máselné jako charakteristického produktu, nazelenalé fluorescenci kolonií pod UV zářením a charakteristické gramnegativní pleomorfní morfologii pod mikroskopem. Dále byla pozorována β -hemolýza na krevním agaru s 5 % koňské krve. Identifikace byla doplněna o test citlivosti na kanamycin a metronidazol, rezistenci na vankomycin a náchylnost k polymyxinu B (Jensen et al., 2007).

Identifikace *F. nucleatum* je podobná. Jsou to gramnegativní pleomorfní tyčinky. Vzorky se převádí na selektivní *Fusobacterium* agar (FSA) a Fastidious anaerobic agar (FAA), který obsahuje hemin, vitamín K a 5 % ovčích erytrocytů. Inkubace trvá 7 dní při 37°C v anaerobním prostředí obsahujícím 90 % N₂ a 10 % CO₂. Nakonec se dělají testy

citlivosti na kolistin, kanamycin a vankomycin, pro které se používá Brucella agar s krví. Po 7 dnech inkubace v anaerobním prostředí se odečítají zóny inhibice. Dále lze k identifikaci použít PCR test (Nwaokorie et al., 2011).

1.2.1.5 Citlivost na ATB rodu *Fusobacterium*

Na prokázání citlivosti rodu *Fusobacterium* spp. jsou použity vzorky od pacientů s dentoalveolárními infekcemi. Některé izoláty *Fusobacterium* byly identifikovány jako *Fusobacterium nucleatum* a některé jako *Fusobacterium necrophorum*. Většina bakterií vykazuje zvýšenou citlivost na amoxicillin, jelikož nejsou přítomny žádné druhy produkující β - laktamázu. Fusobakterie také vykazují citlivost na cefalosporinová činidla, minocyklin, klindamycin a metronidazol. Citlivost na cefaclor a cefuroxim není tak vysoká. Erythromycin a azithromycin prokazují sníženou mikrobiální aktivitu a zvýšená MIC se projevuje u telithromycinu (Kuriyama et al., 2007).

1.2.1.6 Tvorba biofilmu rodu *Fusobacterium*

Mezi faktory hrající důležitou roli při tvorbě biofilmu patří počáteční adheze, koagregace a koadheze, komunikace a růst připojených buněk. První úkol, který musí bakterie splnit, je jejich adsorpce na sliznici se slinami, které obsahují mnoho bílkovin hostitele, hlavně glykoproteiny. Většina bakterií není schopna žít ve slinách, které jsou jejich jediný zdroj výživy. V tomto prostředí dochází k interakcím mezi různými druhy bakterií a nastává komenzální vztah (Periasamy et al., 2009).

U rodu *Fusobacterium* pozorujeme metabolickou spolupráci s dalšími mikroorganismy jako např. *Veillonella* či *Aggregatibacter*. Tato spolupráce dává vzniku multidruhových biofilmů. Rod *Veillonella* není schopen katabolizovat cukry, ale je závislý na organických kyselinách produkovaných jinými mikroorganismy. *Fusobacterium nucleatum* produkuje kyselinu octovou, propionovou, máselnou a mléčnou. *Agg. actinomycetemcomitans* využívá kyselinu mléčnou jako vysoce energetický zdroj uhlíku. Tyto mikroorganismy tedy mají potenciál metabolicky spolupracovat (Periasamy et al., 2009).

1.2.2 Rod *Bacteroides*

1.2.2.1 Mikrobiologická charakteristika rodu *Bacteroides*

Bakterie rodu *Bacteroides* řadíme do čeledi *Bacteroidaceae* (NCBI, Taxonomy Browser, [b.r.]). Jsou to striktně anaerobní, gramnegativní bakterie, které mají tvar tyčinek, vláken i kulatých tělísek. Obvykle bývají opouzďené. Tento rod, ale i rody jemu příbuzné, se nachází na sliznici horních cest dýchacích, trávicího traktu nebo vagíny. U rodu

Bacteroides rozeznáváme několik druhů, které řadíme do skupin. Druhy, které patří do skupiny *Bacteroides fragilis*, většinou bývají izolovány z infekčního materiálu z dutiny břišní a ženského genitálu. *Bacteroides melaninogenicus* tvořící druhou skupinu izolujeme z horních cest dýchacích a endogenních infekcí dolního dýchacího traktu. Druhá skupina se nově řadí do samostatného rodu *Prevotella*. V rámci skupiny bakteroidů můžeme uvést i rod *Porphyromonas*, který se účastní chronické parodontitidy (How et al., 2016).

1.2.2.2 Patogenita a virulence rodu *Bacteroides*

B. fragilis patří mezi mikroorganismy osídluující tlusté střevo. I když je zastoupení toho mikroba pouze 5 %, spadá mezi nejčastěji izolované anaerobní patogeny, částečně kvůli jeho silným virulentním faktorům. Faktory virulence dělíme na faktory potřebné k adhezi tkáně, faktory důležité k ochraně před hostitelskou imunitní odpovědí a faktory používané k poškození či zničení tkáně. Bakteroidy mohou mít všechny tyto vlastnosti. Fimbrie a aglutininy používají k adhezi, což vede k jejich prostupu do tkáně. Polysacharidové pouzdro, LPS a různé enzymy chrání mikroba před hostitelskou imunitní odpovědí. Pouzdro je zodpovědné za tvorbu abscesů a histolytické enzymy zprostředkovávají destrukci tkáně. U některých druhů *B. fragilis* také nacházíme enterotoxin, který může poškodit spojení v intestinálním epitelu a vyvolat průjem (Wexler, 2007).

Infekce spojené s *B. fragilis* bývají polymikrobiální. Pokud je infekce neléčená, míra úmrtnosti pacienta může být až 60 %. Nejběžnější infekce způsobené bakteroidy jsou infekce břišní. Při narušení střevní stěny, prasknutí divertiklu (výchlipka stěny trávicí trubice) nebo jiných perforací tkáně infiltrují členové běžné mikroflóry sterilní peritoneální dutinu. Výsledné infekce poté odrážejí složení střevní mikroflóry. Při akutní fázi nastupují aerobní mikroorganismy, které vytvářejí předběžnou destrukci tkáně. Po odstranění kyslíku přichází na řadu bakteroidy, které se v ideálním prostředí začnou replikovat a akutní fáze přechází do chronické (Wexler, 2007). *B. fragilis* nepatří k přirozené mikroflóře vagíny. V jeho přítomnosti vznikají pánevní infekce, která jsou charakteristické tvorbou abscesů ve žlázách na straně vaginálního otvoru a na vaječnících. Dále nacházíme bakteroidy v infekcích kůže a měkkých tkání, které jsou opět polymikrobiální. Účinky anaerobních mikroorganismů na endokarditidu nejsou obvyklé. Když je tomu naopak, infekce může mít vážné důsledky (Wexler, 2007).

1.2.2.3 Detekce rodu *Bacteroides*

Enterotoxin produkovaný *B. fragilis* indikuje odpověď v ligovaných intestinálních smyčkách a cytotoxickou odpověď v buňkách HT-29 (typ buněčné linie rakoviny tlustého

střeva). Detekce a identifikace enterotoxikogenního *B. fragilis* se provádí kultivací vzorků stolice na selektivní médium a analýzou supernatantu *B. fragilis* na enterotoxinovou aktivitu. Pro detekci rodu *Bacteroides*, která je založena na identifikaci genu kódujícího zinkovou metaloproteázu, se využívá PCR technika (Shetab et al., 1998).

1.2.2.4 Identifikace rodu *Bacteroides*

Bacteroides spp. rostou oproti jiným anaerobním mikroorganismům rychleji a jejich růst na selektivním agaru je odlišný. Pro kultivaci bakteroidů se používá selektivní agar s eskulinem a žlučí. Rod *Bacteroides* hydrolyzuje eskulin na eskuletin a vzniká hnědé zabarvení. *B. fragilis* je rezistentní na kanamycin, vankomycin a kolistin. Žluč se do média přidává pro stimulaci růstu, zatímco na ostatní mikroorganismy působí inhibičně (Wexler, 2007).

K identifikaci lze také využít metodu PCR. Jako rychlý nástroj pro detekci rodu *Bacteroides* využívá primery specifické pro skupinu genu β -izopropylmalátové dehydrogenázy leuB (Wexler, 2007).



Obrázek 1 Vzhled *Bacteroides fragilis*. Kultivace na krevním agaru s vankomycinem a kanamycinem (vlevo) a agar se žlučí a eskulinem, tzv. Bacteroides Bile Esculin Agar (vpravo). Zhnědnutí média je způsobeno hydrolyzou eskulinu (Atlas of Anaerobes, 2016).

1.2.2.5 Citlivost na ATB rodu *Bacteroides*

U rodu *Bacteroides* rozdělujeme dvě skupiny ATB, na něž se provádí citlivost. První skupina, která je testována na metronidazol, chloramfenikol imipenem a meropenem, zaznamenává 99% účinnost. Izoláty rezistentní vůči těmto ATB byly hlášeny ojediněle. Druhou skupinu ATB tvoří ticarcillin/kyselina klavulanová, piperacillin/tazobaktam a ampicilin/sulbaktam. Tato skupina činidel je účinná proti většině (95 až 99 %) izolátů *B. fragilis* a zahrnuje kombinaci inhibitorů β – laktamu / β – laktamázy. Mnoho kmenů produkuje β – laktamázy schopné hydrolyzy β -laktamů, avšak po přidání inhibitorů β – laktamázy se zvýší aktivita β -laktamů. Mezi účinná činidla patří klindamycin a některé cefalosporiny, jako je cefoxitin, cefotetan, ceftizoxim a cefmetazol. Velmi špatnou aktivitu mají proti většině anaerobních bakterií monobaktam, aminoglykosidy a chinolony. Zařadit sem lze i penicilin, který je málo účinný proti těmto mikrobům (Falagas et al., 2000).

1.2.3 Rod *Prevotella*

1.2.3.1 Mikrobiologická charakteristika rodu *Prevotella*

Zástupce rodu *Prevotella* řadíme do čeledi *Prevotellaceae* (NCBI, Taxonomy Browser, [b.r.]). Dříve se tento rod označoval jako druhá skupina rodu *Bacteroides*. Tyto mikroorganismy jsou izolovány z horních cest dýchacích a endogenních infekcí dolního dýchacího traktu (Bednář a kol., 1996). Mají schopnost fermentace glukózy i dalších cukrů a pozorujeme u nich výrazný černý pigment bez fluorescenčních vlastností. Nejvýznamnější je *Prevotella intermedia*. Při osídlení horních cest dýchacích dochází k angínám či sinusitidám. Klinický obraz svědčí pro bakteriální původ, avšak běžná aerobní kultivace bývá negativní, neboť se na tyto mikroby nepomýšlí (Votava a kol., 2003).

1.2.3.2 Patogenita a virulence rodu *Prevotella*

Bakterie rodu *Prevotella* jsou často izolovány z polymikrobiálních perorálních infekcí. Černě pigmentující *Prevotella intermedia* se nachází u zdravých jedinců, ale může být spojena s gingivitidou v těhotenství, akutní ulcerózní nekrotizující gingivitidou a periodontálními lézemi u pacientů s HIV. *P. intermedia* byla rozdělena na *P. intermedia* a *P. nigrescens* dle několika sérologických, biochemických a genotypických variant. Po provedení této taxonomické změny určili někteří výzkumníci *P. intermedia* jako bakterii vyskytující se u nemocných pacientů a *P. nigrescens* jako bakterii nacházející se v běžné ústní mikroflóře. Podle některých výzkumů se uvádí, že tyto bakterie mají určité součásti buněčného povrchu, které umožňují adhezi k epiteliálním buňkám a jsou spojeny

s periodontálním rozpadem. Jako další faktor virulence byla prokázána tvorba proteáz (Maeda, 1998).

1.2.3.3 Detekce rodu *Prevotella*

Kultury se využívají k detekci převládajících nebo specifických druhů u endodontických infekcí. Citlivost je však u těchto metod nízká, zvláště u neselektivních médií s určitými detekčními limity. Molekulární techniky jsou citlivější a mohou detekovat i těžko rostoucí bakterie. Nevýhoda je ve špatné schopnosti rozeznání živých bakterií a zbytků DNA mrtvých bakterií. Kromě toho tato technika detekuje pouze cílené mikrobiální druhy. Pro detekci rodu *Prevotella* a jeho rozdělení se využívá metoda PCR (Tomazinho et al., 2007).

1.2.3.4 Identifikace rodu *Prevotella*

Identifikace může proběhnout za použití systému Rapid ID 32 A (bioMérieux, Francie). Rod *Prevotella* včetně *P. intermedia* a *P. nigrescens* poskytuje tmavě červenou fluorescenci, negativní BANA (N-benzoyl-DL-arginin-2-naftylamid) hydrolýzu a pozitivní aktivitu o – glukosidázy. Tyto bakterie mohou být identifikovány pomocí metody PCR s denaturační gradientovou gelovou elektroforézou (PCR-DGGE). Část genu 16S rRNA je amplifikována metodou PCR a oddělena pomocí DGGE (denaturační gradientové gelové elektroforézy). Nakonec proběhne sekvenování genu a následná identifikace (Machado de Oliveira, 2007).

1.2.3.5 Citlivost na ATB rodu *Prevotella*

Citlivost na ATB se u rodu *Prevotella*, nacházejícího se v dutině ústní, pomalu snižuje a roste počet rezistentních kmenů. Citlivost klesá hlavně u ATB, jako jsou penicilin, klindamycin a makrolidy. Vysokou citlivost nabízí amoxilin či spojení amoxilin/kyselina klavulanová. Mezi účinná ATB patří také linezolid, který je ze skupiny oxazolidinonů a působí inhibicí syntézy proteinů. Je účinný proti multirezistentním a anaerobním mikroorganismům (Machado de Oliveira, 2007).

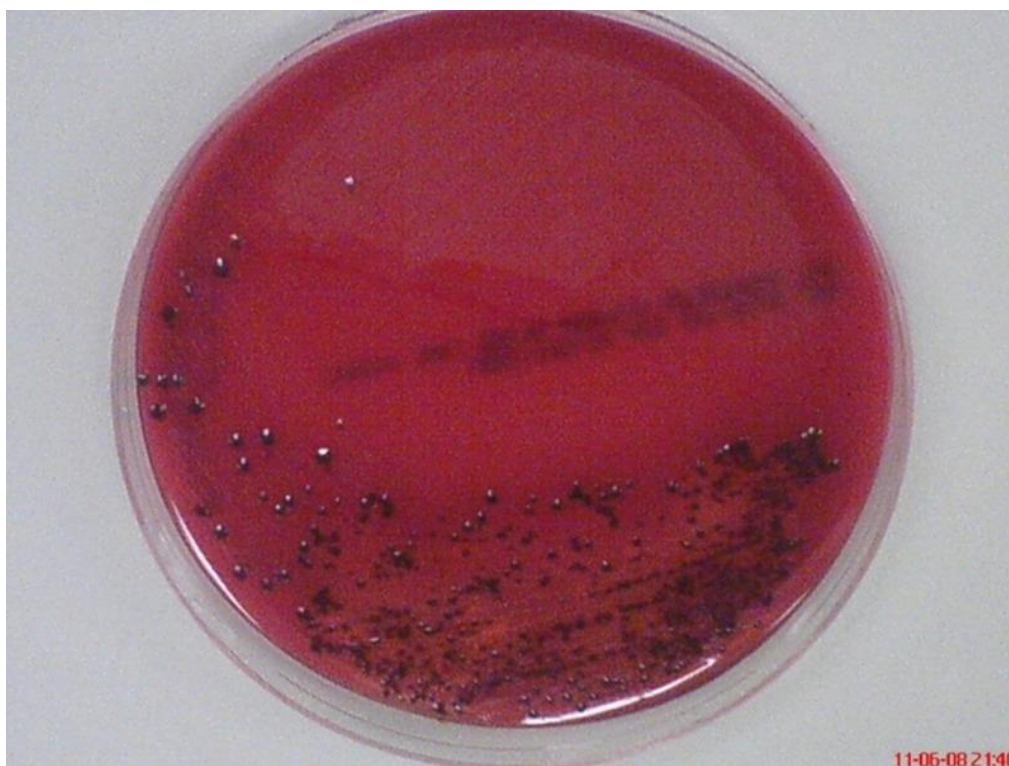
1.2.3.6 Tvorba biofilmu rodu *Prevotella*

Parodontitida má multifaktorovou etiologii a je spojena se zvýšeným počtem anaerobů v biofilmu zubního plaku. Z biofilmu periodontálních lézí jsou nejčastěji izolovány bakterie *P. gingivalis*, *P. intermedia* a *P. nigrescens*. Parodontóza je způsobena rozsáhlou synergickou mikroflórou, kde mají různé druhy bakterií odlišné role, aby se vytvořila stabilizovaná mikroflóra podporující onemocnění, tzv. biofilm (Barbosa et al., 2015).

1.2.4 Rod *Porphyromonas*

1.2.4.1 Mikrobiologická charakteristika rodu *Porphyromonas*

Zástupce rodu *Porphyromonas* řadíme do čeledi *Porphyromonadaceae* (NCBI, Taxonomy Browser, [b.r.]). Zástupci této skupiny jsou gramnegativní anaerobní nesporeující tyčinky. Mají velice slabou sacharolytickou aktivitu, tzn. nedokáží fermentovat glukózu ani jiné cukry. Kolonie jsou hnědočerné a pod UV fluoreskují. Nejznámější původce lidského onemocnění je *Porphyromonas gingivalis*. Tato bakterie běžně osídluje dutinu ústní nebo urogenitální trakt. Vzniklé infekce se poté týkají těchto míst (Votava a kol., 2003).



Obrázek 2 Kultivace *Por. gingivalis*. Černé pigmentované kolonie periodontopatogenu *Por. gingivalis* na agaru s koňskou krví. Předpokládá se, že pigment souvisí s akumulací heminu na povrchu buněk (How et al., 2016).

1.2.4.2 Patogenita a virulence rodu *Porphyromonas*

Parodontitida je onemocnění, kdy dochází ke ztrátě rovnováhy mezi mikrobiálními virulentními látkami a hostitelskou imunitou v interakci mezi hostitelem a parazitem. Proto se toto onemocnění nepovažuje za homogenní. *Por. gingivalis* je přítomna v periodontálních kapsách, které procházejí destrukcí (Enersen et al., 2013).

Zatímco některé studie klasické interakce mezi hostitelem a parazitem brali faktor virulence jako škodlivou molekulu tzv. toxin, nedávná pozorování spíše přirovnávají faktor virulence k molekulám vytvářejícím a udržujícím určitý druh spojení s hostitelem. Mohou tak

fungovat ve vztahu symbiotickém či parazitárním uvnitř hostitele. Aby mohla bakterie vytvářet potencionální faktor virulence, musí nalézt v hostiteli vhodné místo působení, usadit se, růst a množit se. Toto prostředí je pro bakterie velice důležité, jak z hlediska přežití, tak pro produkci maximální biologické aktivity. Mnoho bakterií proniká přes bariérové membrány (sliznice), aby se mohlo spojit s vybranými hostitelskými buňkami (např. epiteliální buňky či fibroblasty). Tvorba bakterií v hostiteli patří k nezbytnému kroku při kolonizaci. Některé bakterie jsou chráněny mechanismy hostitele, jelikož se nachází v intracelulární poloze. Zbytek bakterií produkuje faktory virulence, které jim pomáhají přežít. Tyto faktory umožňují konkurovat komenzálnímu prostředí hostitele produkováním antimikrobiálních molekul. Mezi tyto molekuly patří bakteriociny a konečné produkty metabolismu (organické kyseliny, alkoholy, anorganické báze, sloučeniny obsahující síru a amoniak). Mezi další důležité molekuly patří vázající proteiny, z nichž významné jsou proteiny vázající železo. Bakteriální faktory také fungují jako ochrana bakterie před imunitou a obranou hostitele (sérové faktory, včetně imunoglobulinů a složek komplementu). Další funkce je tvorba exopolysacharidů, které z viditelné bakteriální buňky dělají buňku neviditelnou pro imunitu hostitele (Holt et al., 1999).

Kolonizace hostitele se provádí pomocí různých faktorů virulence (tabulka 2), včetně fimbrií, lipoteichoových kyselin, lipopolysacharidů, exopolysacharidů a vezikulů vnější membrány (Holt et al., 1999).

Fimbrie jsou pro tento mikroorganismus velice důležité, protože se účastní skoro všech interakcí mezi bakterií a hostitelem. Tento patogen produkuje na svém povrchu dva odlišné druhy fimbrií. Jedna je složena z podjednotkového proteinu fimA (fimbrilin), který kóduje gen fimA, a druhý tvoří podjednotka Mfa proteinu (Enersen et al., 2013). Lipopolysacharid (LPS) je jeden z klíčových faktorů virulence u vzniku parodontitidy *Por. gingivalis*. Vyvolává tvorbu prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-6 a IL-8, které indikují destrukci periodontální tkáně a narušují proces remodelování kosti (Kato, 2014).

Tabulka 1 Faktory virulence a hostitelské efekторы rodu *Porphyromonas gingivalis*
(How et al., 2016, přepracováno 05-15-2018).

Faktory virulence	Vliv na hostitele
Enzymy, kapsle	Snížení fagocytózy při invazi, inhibitory chemotaxe
Lipopolysacharid	Kostní resorpce, imunoglobulinové proteázy
Fimbrie, exopolysacharidy, proteiny vnější membrány	Přilnavost nebo připojení na hostitele
Kolagenáza, proteáza, gelatináza	Degradace inhibitorů plazmatických proteáz, destrukce periodontální tkáně
Aminopeptidáza	Degradace transportního proteinu železa

Mikroflóra dutiny ústní obsahuje četné množství bakteriálních druhů. Většina je neškodná, ale kolonizace subgingiválního plaku určitými druhy může vést až k periodontálnímu onemocnění. Parodontitida je chronické multifaktoriální zánětlivé onemocnění, které vede k destrukci tkání podporujících zuby a je také hlavní příčinou ztráty zubů. Může se vyskytovat u lidí i zvířat. Parodontické léze jsou spojeny s komplexní subgingivální mikroflórou, která obsahuje spíše gramnegativní druhy, z nichž tmavě pigmentovaný je mikroorganismus *Porphyromonas gingivalis*. Tento rod patří mezi přísné anaerobní orální mikroorganismy účastníci se parodontitidy, vzniku zubních abscesů (dutiny vyplněné hnisem) či bakteriálních infekcí kořene zubu (Bouthaga et al., 2003). *Porphyromonas gingivalis* přežívá v primárních gingiválních epiteálních buňkách. Pro rychlý vstup do těchto buněk je zapotřebí metabolické aktivity bakterií a hostitelských buněk. Adherence *Por. gingivalis* je zprostředkována primárně vazbou hlavních fimbrií na integrinové receptory (membránové receptory) (Yilmaz et al., 2005).

Porphyromonas gingivalis hraje jednu z nejdůležitějších rolí při vzniku parodontitidy. Vzhledem k rozsáhlé genetické variabilitě, která byla pozorována u tohoto druhu a k přítomnosti velkého množství kmenových typů, bylo předpokládáno, že všechny kmeny

jsou stejně virulentní. Jelikož však byla nalezena i u zdravých jedinců, nastává otázka, zda neexistuje kmen s nízkou virulencí (Griffen et al., 1999).

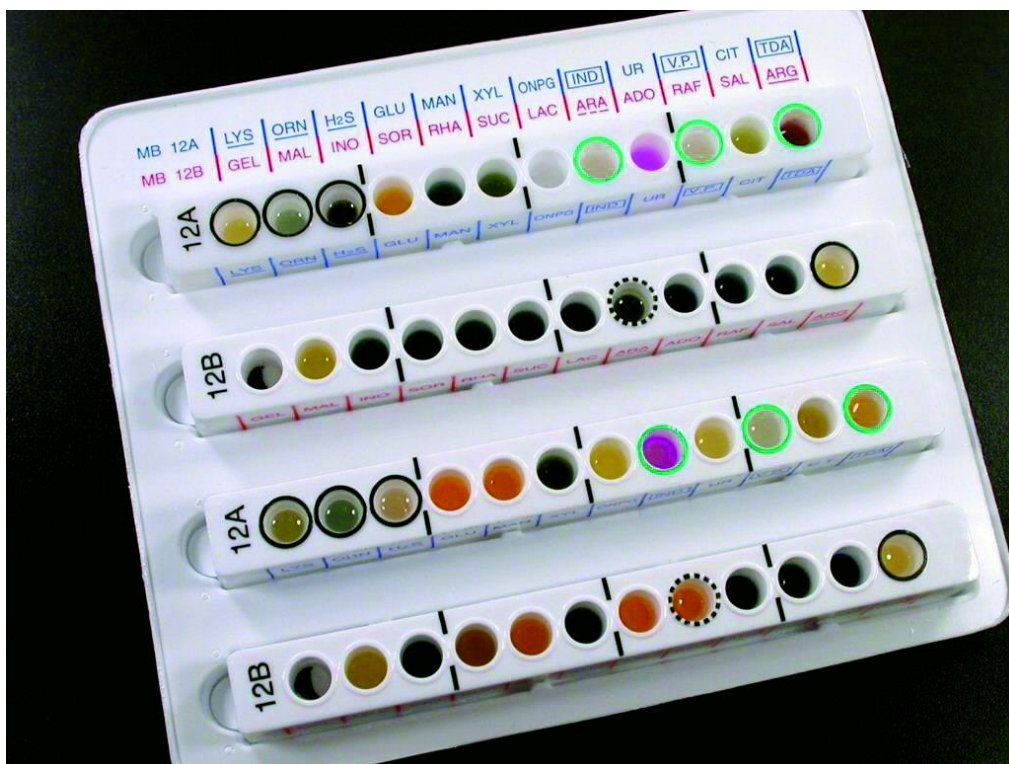
1.2.4.3 Detekce rodu *Porphyromonas*

PCR metoda se používá jak pro detekci, tak pro identifikaci mikroorganismu *Por. gingivalis*. Problém nastává v případě PCR-pozitivního/kultivace-negativního výsledku. Tento rozdíl je způsoben nižším detekčním limitem PCR v rozmezí od 25 do 100 buněk ve srovnání s kulturou (10^4 - 10^5). Při srovnání komerčního multiplexního PCR 16S rRNA pro *Por. gingivalis* se standardní kultivací, bylo PCR více schopné detekovat mikroorganismus než kultivace. Většina testů PCR používá jako primery 16S rRNA geny. Malý počet PCR testů využil jako primery oligonukleotidy, kódující geny např. pro kolagenázu (Sanz et al., 2004). Ikdyž PCR v reálném čase vykazuje vysoký stupeň citlivosti, specifčnosti a reprodukovatelnosti, stále je to velice drahá metoda a pro rutinní diagnostickou mikrobiologickou laboratoř velmi nákladná (Rajakaruna et al., 2018).

1.2.4.4 Identifikace rodu *Porphyromonas*

Pro identifikaci byly odebrány vzorky gingiválního plaku pacientů s parodontitidou. Z těchto vzorků byla provedena kultivace na destičky s krevním agarem (Oxoid, č.2), který byl doplněn koňskou krví, heminem (5 mg/ l) a menadionem (1 mg/l). Destičky byly inkubovány v prostředí 80%N₂, 10%H₂ a 10% CO₂ při 37°C po dobu 7 až 14 dnů. Identifikace *Por. gingivalis* poté proběhla na základě Gramova barvení a anaerobního růstu. Dále byl proveden test na fermentaci glukózy, který byl negativní, produkci indolu a hemaglutinaci ovčích erytrocytů, která byla pozitivní. U identifikace nesmí chybět i celkový počet CFU (neboli kolonie tvořících jednotek). Dle celkového počtu CFU určíme, zda se jedná o infekci. Počet CFU hodnotíme s danou minimální denzitou pro vznik infekce. (Bouthaga et al., 2003).

Od doby nástupu PCR technologie existuje řada mikrobiologických testů pro detekci a identifikaci *P. gingivalis* a jiných mikroorganismů způsobujících infekce v dutině ústní. A to různé DNA extrakční metody a primery PCR, které jsou oproti konvenčním metodám kultivace přesnější v identifikaci periodontálních patogenů a prokazují vyšší frekvenci detekce (Sanz et al., 2004). Pomocí soupravy pro rychlou detekci (tzv. Rapid ID kit 32A viz Obr. 3) se testuje produkce souboru metabolických enzymů Nejrychlejší a nejpohodlnější identifikační systém představuje jednoduchost, zajištěnou jednokrokovým inokulačním postupem a umožňuje přesnou identifikaci komplexního rozsahu mikroorganismů během 4 hodin. Tato metoda detekuje předem vytvořené bakteriální enzymy, není tedy závislá na růstu mikroorganismu (Laboratory News Network, 2010).



Obrázek 3 Test na rychlou detekci mikroorganismu řady RapID (Laboratory News Network, 2010).

1.2.4.5 Citlivost na ATB rodu *Porphyromonas*

K léčbě infekcí spojených s *Por. gingivalis* se používají antiseptické látky a antibiotika. Antiseptický chlorhexidin byl hojně využíván v zubním lékařství. Mezi jeho výhody patří širokospektré působení a lze ho použít ve formě gelů, čípků, ústních vod či filmů. Nežádoucími účinky jsou hnědé zbarvení zubů, změna chuti a otoky dásní. Dále bylo navrženo několik tříd ATB včetně tetracyklinů, makrolidů, linkosaminů, β -laktamů nebo nitroimidazolů. Avšak buňky umístěné v biofilmu mohou být vůči těmto ATB méně citlivé či rezistentní. Mezi nové antibakteriální látky patří inhibice tzv. quorum sensing (mechanismus mezibuněčné komunikace). Quorum sensing spoléhá na chemické signály tzv. autoinduktory. Potlačení těchto autoinduktorů nebo navržení jejich antagonistů vede k nové strategii v manipulaci s biofilmy (Chen et al., 2018). Tato metoda nemá vliv na růst bakterií, a proto mají nízkou schopnost vývoje rezistence. Používaná činidla nejsou toxická pro lidské monocytární buňky, lidské gingivální fibroblasty a neindikují produkci protizánětlivých faktorů. Mezi možnosti budoucí léčby nově řadíme antimikrobiální peptidy, neboť mají širokospektrou aktivitu a nízkou tendenci k rozvoji rezistence (Gerits et al., 2017).

1.2.4.6 Tvorba biofilmu rodu *Porphyromonas*

Tvorba biofilmu je dynamický, komplexní a vícestupňový proces. Nejdříve nastává adherence bakterie na biotické a abiotické povrchy, poté biofilmy dozrávají v trojrozměrné struktury obsahující mikrokolonie, ve kterých probíhá vzájemné ovlivňování mezi různými druhy. Nakonec se buňky dispergují z biofilmu, což umožňuje tvorbu nových biofilmů (Gerits et al., 2017).

Rod *Porphyromonas gingivalis* je schopen tvořit tři druhové komunity spolu s *Fusobacterium nucleatum* a *Streptococcus gordonii*. Proteomika v této komunitě odhalila u *Por. gingivalis* zvýšenou tvorbu bílkovin, které se zapojují do proteosyntézy, což znamená, že je pro *Por. gingivalis* výhodné soužití s jinými mikroorganismy. V přítomnosti biofilmu společně se *Streptococcus sordonii* navíc byly přítomny diferenciatně regulované geny. Rod *Porphyromonas gingivalis* je tedy schopen tvořit multidruhovou biofilmovou komunitu s kolonizátory *Streptococcus sordonii*, *Veillonella* spp., běžným kolonizátorem *Fusobacterium nucleatum* a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Periasamy et al., 2009).

1.2.5 Rod *Bilophila*

1.2.5.1 Mikrobiologická charakteristika rodu *Bilophila*

Zástupce rodu *Bilophila* řadíme do čeledi *Desulfovibrionaceae* (NCBI, Taxonomy Browser, [b.r.]). Jsou to mikroorganismy gramnegativní, striktně anaerobní a ve tvaru tyčinek (Bednář a kol., 1996). Tento rod reprezentuje zatím jen jeden druh – *Bilophila wadsworthia* (Votava a kol., 2003).

1.2.5.2 Patogenita a virulence rodu *Bilophila*

Bilophila wadsworthia je mikrob, který redukuje siřičitany a produkuje sirovodík. Tento mikrob byl izolován z peritoneální tekutiny a tkáně pacientů s apendicitidou. V nadměrném zastoupení byl také nalezen v kolorektální mikroflóře u pacientů s kolorektálním karcinomem, což může naznačovat jistou úlohu při karcinogenezi. Ačkoliv jsou známy korelace tohoto mikroba s různými chronickými onemocněními, mechanismy jeho patogenity nejsou dobře charakterizovány. Nově byly odebrány izoláty *Bilophila wadsworthia* i od pacientů se začínající LADA (latentní autoimunitní diabetes u dospělých) (Feng, 2017).

1.2.5.3 Detekce rodu *Bilophila*

Pro detekci *Bilophila wadsworthia* se využívá hlavně Real-time PCR. U onemocnění LADA bylo pro PCR techniku použito vybavení SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 170 - 8882AP). Živé buňky mohou být také detekovány pomocí počítání destiček na ABB (Anaerobe Basal Broth) bujónu doplněného taurinem a rimpaficinem. Sérové koncentrace zánětlivých markerů (sérový amyloid, lipopolysacharidový vazebný protein, interleukin-6 a tumor nekrotizující faktor) stanovuje ELISA metoda (Feng, 2017).

1.2.5.4 Identifikace rodu *Bilophila*

V mikroskopu vypadá tento mikrob stejně jako rod *Bacteroides*. Vykazuje silnou katalázovou reakci. Je nesacharolytický, ale snáší až 20% obsah žluči v prostředí (Votava a kol., 2003). Na ABB agaru doplněného taurinem vytváří kruhové černé nebo průsvitné kolonie s černým středem. Pod mikroskopem pozorujeme tyčinky bez bičíků (Feng, 2017). K identifikaci se též používá metoda PCR, která detekuje gen tPA. Tento gen kóduje redukci siřičitanů, přičemž taurin je zdroj siřičitanů v kombinaci s jinými organickými látkami. Během degradace taurinu je nejvíce zapojen enzym taurin-pyruvát aminotransferáza, který je kodován genem tPA a detekován PCR metodou. Samy bakterie tohoto rodu iniciují vznik síry z taurinu přes tPA (Laue et al., 2006).

1.2.5.5 Citlivost na ATB rodu *Bilophila*

Bilophila wadsworthia je mikrob rezistentní vůči většině β -laktamových antibiotik, díky produkci β -laktamázy. Rezistentnost vykazuje k vankomycinu a při změně proteinu vázajícího penicilin, což činí tuto bakterii klinicky zajímavou. Citlivost vykazuje na meropenem, amoxilin/kyselinu klavulanovou, kanamycin, kolistin, metronidazol, imipenem a chloramfenikol (Urban et al., 2004).

1.2.6 Rod *Mobiluncus*

1.2.6.1 Mikrobiologická charakteristika rodu *Mobiluncus*

Zástupce rodu *Mobiluncus* řadíme do čeledi *Actinomycetaceae* (NCBI, Taxonomy Browser, [b.r.]). Jsou to striktně anaerobní pohyblivé zahnuté tyčinky, které mohou být gramnegativní nebo gramlabilní. Většinou vyvolávají některá zánětlivá postižení vagíny. Patří sem druhy *Mobiluncus mulieris* a *Mobiluncus curtisii* s poddruhem *Mobiluncus holmesii* (Hoyles, 2015).

1.2.6.2 Patogenita a virulence rodu *Mobiluncus*

Tyto bakterie jsou pohyblivé díky několika subpolárním bičíkům. Některé kmeny se po několikanásobném pasážování stávají aerotolerantními a mohou růst v částečně redukované atmosféře. Mají vícevrstvou buněčnou stěnu bez vnější membrány, avšak s tenkou vrstvou peptidoglykanu. V buněčné stěně chybí hydroxylované mastné kyseliny, jako např. hexadekanová, oktadekadienová a oktadecenová. Mezi další důležitou součást virulence patří bičíky, které se objevují u většiny druhů těchto bakterií. Po expozici se stávají bakterie nepohyblivé. Tento rod je součástí běžné mikroflóry ženské vagíny. Jeho přítomnost je však detekována i u infekcí spojených s kandidální vaginitidou, chlamydiovou infekcí, kapavkou, trichomoniázou a nespecifickou uretritidou (Hoyles, 2015).

1.2.6.3 Detekce a identifikace rodu *Mobiluncus*

Detekce proběhla na základě sekvenování reverzní transkriptázy 16S rRNA *Mobiluncus mulieris* a *Mobiluncus curtisii* (Hoyles, 2015). Optimální teplota pro růst těchto bakterií je 35 - 37°C. Pro stimulaci růstu lze využít koňské nebo ovčí sérum, popř. plnou krev. Bakterie tohoto rodu jsou oxidáza a kataláza negativní, sacharolytické. Mezi produkty fermentace patří kyselina octová a jantarová. Na Columbia agaru doplněného lidskou krví, roste po 5 dnech ve větších koloniích šedobíle až nažloutle. Buňky jsou usmrceny při 55°C po dobu 55 minut (Hoyles, 2015). *M. mulieris* roste na krevním agaru v malých konvexních a bezbarvých koloniích, které se lesknou. Na Columbia agaru produkuje alfa hemolýzu a po prodloužené době inkubace také tmavohnědý pigment (Hoyles, 2015).

1.2.6.4 Citlivost na ATB rodu *Mobiluncus*

Bakterie tohoto rodu jsou citlivé na ampicilin, cefoxitin, cefazolin, klindamycin, gentamicin, imipenem, streptomycin a vankomycin. Rezistence je prokázána vůči kolistinu, cykloserinu, kyselině nalidixové, neomycinu a mezlocilinu (Hoyles, 2015).

1.2.6.5 Tvorba biofilmu rodu *Mobiluncus*

Bakterie tohoto rodu se podílejí na bakteriální vaginóze spolu s ostatními mikroorganismy. Vytvoření biofilmu hraje klíčovou roli při bakteriální vaginóze a jeho přítomnost byla dokázána na více než 90 % epitelů vaginálních bioptických vzorků. Biofilm se skládá z mikroorganismů *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus mulieris* a dalších. Předem vytvořené biofilmy *Gardnerella vaginalis* dokáží vytvořit symbiotický vztah s jinými anaerobními mikroorganismy. *M. mulieris* vytváří během svého vývoje proteolytickou aktivitu prostřednictvím aminopeptidáz. Dostupné peptidy a aminokyseliny

poté usnadňují anaerobní růst biofilmu ve vaginálním epitelu. Zvýšená dostupnost peptidů *M. mulieris* působí jako faktor podporující vývoj multidruhového biofilmu iniciovaného *Gardnerella vaginalis* (Machado et al., 2015).

1.3 Gramnegativní anaerobní koky

Za neškodnou součást lidské mikroflóry jsou považovány rody *Acidaminococcus* a *Megasphaera*. Klinicky významný je až třetí rod, a to rod *Veillonella* (Votava a kol., 2003).

1.3.1 Rod *Veillonella*

1.3.1.1 Mikrobiologická charakteristika rodu *Veillonella*

Zástupce rodu *Veillonella* řadíme do čeledi *Veillonellaceae* (NCBI, Taxonomy Browser, [b.r.]). Tento rod zahrnuje velmi drobné gramnegativní koky. Koky jsou poté uspořádány do dvojic nebo menších shluků. Rod *Veillonella* se většinou účastní smíšených endogenních anaerobních infekcí. Jediný druh prokázaný jako patogenní, je *Veillonella parvula*. Ta bývá izolována z krve jako samostatné agens při sepsích a endokarditidách (Votava a kol., 2003).

1.3.1.2 Patogenita a virulence rodu *Veillonella*

Rod *Veillonella* je vzácnou příčinou vážných infekcí, jako je meningitida, osteomyelitida, infekce kloubních náhrad, pleuropulmonální infekce, endokarditida a bakteriémie. Mezi rizikové faktory, které ovlivňují vznik infekce, patří periodontální onemocnění, imunodeficit, intravenózní užívání drog či u těhotných předčasné narození dítěte (Marriott et al., 2007).

1.3.1.3 Detekce rodu *Veillonella*

Jako nejvíce specifický a stabilní marker pro detekci těchto bakterií se ukázalo sekvenování genu 16S rRNA. Tato metoda byla popsána jako nejlepší v detekci a identifikaci na úrovni druhu (Marriott et al., 2007).

1.3.1.4 Identifikace rodu *Veillonella*

Pro kultivaci se používá BHI (Brain Heart Infusion) agar, na kterém rostou v malých šedých koloniích. Nejsou schopné fermentovat glukózu. Test na idol a katalázu je negativní, ale mohou redukovat dusičnany na dusitany. Některé kmeny vyžadují v médiu kadaverin nebo putrescin. Dále se k identifikaci využívá metoda PCR (Atlas of Oral Microbiology, 2015).

1.3.1.5 Citlivost na ATB rodu *Veillonella*

Penicilin je považován za antimikrobiální látku používanou k léčbě infekcí způsobených tímto mikroorganismem. Avšak izoláty z úst v poslední době prokazují vůči penicilinu vysokou odolnost. Tyto izoláty měly sníženou citlivost na ampicilin a amoxicilin. Citlivost byla prokázána ke kombinaci amoxicilin/kyselina klavulanová a cefalosporinům. Obecně mají tyto organismy rezistenci na tetracyklin, vankomycin a aminoglykosidy (Marriott et al., 2007).

1.3.1.6 Tvorba biofilmu rodu *Veillonella*

Tyto bakterie nikdy netvoří primární biofilm. Většinu počáteční kolonizace tvoří streptokoky a aktinomycety, zatímco *Veillonella* se s nimi shlukují a vytváří sekundární vrstvu. Ta vznikne na základě koadheze a koagregace s přilnutými streptokoky a aktinomycety. Dále se s nimi mohou shlukovat rody *Fusobacterium* a *Aggregatibacter*. Rod *Veillonella* využívá kyselinu mléčnou, kterou produkují streptokoky a aktinomycety. Tento biochemický proces využívají ke zvýšení rozmanitosti komunitního rozvoje (Periasamy et al., 2009).

1.4 Grampozitivní anaerobní sporulující tyčinky

Do této skupiny patří hlavně rod *Clostridium*. Bakterie rodu *Clostridium* řadíme do čeledi *Clostridiaceae* (NCBI, Taxonomy Browser, [b.r.]). Tyto sporulující bakterie rostou za anaerobních podmínek. Ovšem některé druhy (*Clostridium perfringens*, *Clostridium histolyticum* a *Clostridium tertium*) mohou tolerovat malé množství kyslíku díky přítomnosti enzymů, jako jsou superoxid-dismutáza, peroxidáza, či kataláza, neutralizujících kyslíkové a peroxidové radikály (Votava a kol., 2003).

1.4.1 *Clostridium difficile*

1.4.1.1 Mikrobiologická charakteristika *Clostridium difficile*

Tato bakterie patří mezi silné, grampozitivní, sporulující, anaerobní tyčinky a je schopna vytvářet velmi odolné spory. Tvorba spor je určující pro riziko a povahu šíření tohoto původce v nemocnici (Jindrák a kol., 2014).

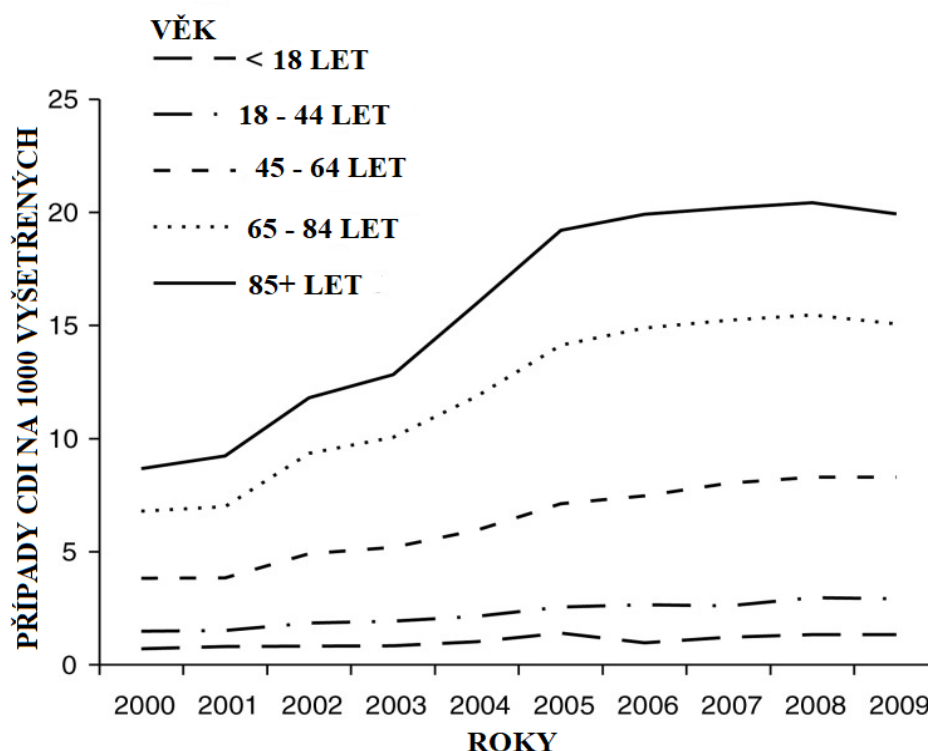
1.4.1.2. Patogenita a virulence *Clostridium difficile*

Virulence je způsobena produkcí několika toxinů s cytoplasmatickou aktivitou poškozujících střevní sliznici a způsobujících pseudomembranózní zánět (toxin A, B a binární toxin). U některých kmenů může být hypervirulence, pro kterou je typická zvýšená produkce více typů toxinů (všech tří). Především se jedná o pandemicky se šířící ribotyp 027, který se vyznačuje extrémně vysokou produkcí toxinů A a B a snadným šířením nemocničním

prostředím z důvodu neobvykle velké tvorby spor. V České republice pozorujeme ještě ribotyp 179. Tento ribotyp má podobné vlastnosti s ribotypem předešlým a může vyvolat nebezpečné epidemie v nemocnicích s vysokou mortalitou (10 až 15 %) (Jindrák a kol., 2014).

Bakterie se dostává do těla požitím spor, které se nacházejí na rukách jiných pacientů či zdravotnického personálu. Poté klíčí v tenkém střevě do vegetativní formy. Přerušení fyziologické střevní flóry umožňuje *C. difficile* proliferovat a způsobovat široké spektrum klinických projevů od asymptomatického transportu, až po průjmy různého stupně. Infekce způsobená *C. difficile* často vede k fulminantní (akutní, těžké) kolitidě a může způsobit smrt (Lessa et al., 2012).

Clostridium difficile kolonizuje především tlusté střevo, kde uvolňuje dva proteinové exotoxiny, a to toxin TcdA a TcdB. U vnímavých lidí mohou způsobovat kolitidu. Infekce je přenášena pomocí spor odolných vůči teplu, ATB a kyselinám. Spory se hojně nacházejí ve zdravotnických zařízeních, v potravinách a v malé míře je nalézáme i kolem nás, což umožňuje nosokomiální a komunitní přenos. Kolonizaci, která by mohla vzniknout ve střevě, brání bariérové vlastnosti fekální mikroflóry. Avšak tato ochrana bývá snižována při užívání ATB. Mezi další faktory přispívající k citlivosti řadíme pokročilý věk, léčbu pomocí chemoterapie nebo jiné závažné onemocnění. Infekce způsobená *C. difficile* byla poprvé rozpoznána v západní Evropě a severní Americe, kde vznikl kmen BI / NAP1/ 027. Nyní má globální dosah a epidemické kmeny lze nalézt v různých nemocnicích na celém světě (Longo et al., 2015).



Obrázek 4 CDI infekce. Míra výskytu infekce způsobené *C. difficile* při krátkodobé hospitalizaci v nemocnicích v USA podle věku. Zkratka: CDI, *Clostridium difficile* infection (Lessa et al., 2012, přepracováno 03-31-2018).

1.4.1.3 Detekce *Clostridium difficile*

Pro detekci využívají klinické laboratoře imunoanalýzu toxinů *C. difficile* nebo běžného antigenu glutamát-dehydrogenázy. Toxinové enzymové imunoanalýzy se často používají jako samostatné testy, ale citlivost může být nedostatečná, obzvláště pokud je detekován jen toxin A. Proto současné EIA antigenů přesně detekují esenciální a konstitutivně syntetizovaný enzym, a tím rychle detekují *C. difficile*. Citlivost toxinových EIA i starší latex-aglutinačních antigenních testů je nižší než EIA antigenů. Jelikož antigenní EIA detekují toxigenní i netoxigenní druhy, musí být provedena kombinace s toxinovými EIA (Ticehurst et al., 2006).

1.4.1.4 Identifikace *Clostridium difficile*

Pro identifikaci *C. difficile* se využívají různá selektivní média. Pro rychlé odečítání kolonií byl zkoušen selektivní agar chromID *C. difficile*. Dále se používá TCCA (taurocholát, cykloserin a cefoxitin) agar, CCFA (cykloserin, cefoxitin a fruktóza) agar a CLO (*C. difficile*) médium. Cykloserin a cefoxitin inhibují růst nechtěné mikroflóry. Taurocholát a lysozym zvyšují citlivost média pro růst mikroorganismu. Ke zvýšení citlivosti kultury lze využít i teplotní šok, neboť spory *C. difficile* přežívají, ale jiné organismy jsou teplem usmrceny (Eckert et al., 2013).

1.4.1.5 Citlivost na ATB *Clostridium difficile*

V současné době jsou pro léčbu CDI doporučována ATB metronidazol, vankomycin a fidaxomicin. U infekce, která byla způsobena narušením přirozené mikroflóry pomocí ATB, stačí ukončit podávání těchto ATB a podněcování infekce. Tato metoda se však volí u velmi mírných infekcí. Pacienti, kteří mají buď mírnou, nebo středně závažnou CDI, mohou být léčeni perorálním podáváním metronidazolu. Perorální vankomycin se pak doporučuje u velmi těžkých či komplikovaných infekcí. Současná ATB jsou spojena se sníženou klinickou léčbou a zvýšenou mírou recidivity. Při léčbě CDI se také vylučují léky proti motilitě střeva. Pacienti s vážnou CDI, jako např. paralyzované střevo nebo toxický megakolon, u kterého perorální ATB nedosáhnou na místa onemocnění, mohou být léčeni vankomycinem podaným přes konečník nebo intravenózním metronidazolem. U pacientů s toxickým megakolonem, dysfunkcí orgánů, klinickými příznaky a závažnou neprůchodností střev je na místě použití chirurgické léčby.

Pacienti, kteří prodělali CDI, mají pravděpodobnost recidivy během 8 týdnů 15-25 %. U pacientů s 1–2 předchozími recidivami je pravděpodobnost další recidivy 40–65 %. Příčinnou opakovaných recidiv je snížená imunitní odpověď na toxin *C. difficile* nebo změna mikroflóry ve střevě. U perorální léčby fidaxomicinem je méně recidiv než při podávání vankomycinu. Proto se také používá fidaxomicin k léčbě první recidivy.

Jako nová možnost léčby CDI byla navržena bakterioterapie a transplantace fekálních buněk. FMT (transplantace mikrofiltru ve stolici) je vhodná pro pacienty s více než 2 recidivami, u nichž chybí odpověď na jiné možnosti léčby. FMT patří mezi nestandardizované postupy, jelikož nejsou známy dlouhodobé důsledky změny mikroflóry u pacienta. Při dalším použití bakterioterapie bude potřeba získat dlouhodobé údaje o bezpečnosti rektální bakterioterapie (Smith et al., 2016).

1.4.1.6 Tvorba biofilmu *Clostridium difficile*

Opakované bakteriální infekce jsou spojeny se schopností *C. difficile* tvořit biofilmy. Tyto bakterie jsou trvale recidivující a tvoří biofilmy spolu s jinými druhy. Nicméně tvorba biofilmu u *C. difficile* a mechanismy, které se na vzniku biofilmu podílejí, nejsou dobře charakterizovány. *C. difficile* způsobuje těžké gastrointestinální infekce a tvorbou biofilmu snižuje citlivost k léčbě. Bakterie jsou v biofilmu uzavřené v husté matici (Thapa et al., 2013).

1.4.2 *Clostridium botulinum*

1.4.2.1 Mikrobiologická charakteristika *Clostridium botulinum*

Pod označením *Clostridium botulinum* je zahrnuta heterogenní skupina bakterií. Mezi společný znak těchto bakterií patří tvorba toxinu se shodným biologickým účinkem, avšak různou antigenní strukturou. Podle této struktury se dělí na antigenní typy A-G. Neurotoxin produkovaný *C. botulinum* považujeme za nejsilnější z bakteriálních toxinů a je příčinou botulismu neboli otravy klobásovým jedem. Z morfologického hlediska se jedná o velkou, rovnou, grampozitivní a pohyblivou tyčinku a rozměrech 1 x 10 i více μm (Votava a kol., 2003). Jsou to striktně anaerobní a sporulující bakterie. Přirozeně se nachází ve formě spor v půdě nebo sedimentech vody. Na základě vnějších podmínek pozorujeme dvě formy tohoto mikroorganismu. Vegetativní forma přežívá pouze v anaerobním prostředí, kde se může rozmnožovat, metabolizovat a tvořit botulotoxin. V této formě je *C. botulinum* citlivé na vnější podmínky a lze jej eliminovat teplem (var, pasterizace), dezinfekčními prostředky, kyselinami či zásadami. V nepříznivých podmínkách se mění na spory, které zabezpečují jeho přežití. Spory jsou rezistentní z důvodu nepřítomnosti vody v jejich strukturách a přítomnosti vápenatého obalu. Jakmile se spora dostane do vyhovujících podmínek, začne přeměna ze spory na vegetativní formu. Kmeny *C. botulinum* rozdělujeme do 4 skupin, a to na základě biochemické aktivity a dalších biologických vlastností (Votava a kol., 2003).

1.4.2.2 Patogenita a virulence *Clostridium botulinum*

Botulotoxin je příčinou onemocnění zvaného botulismus a existuje v 7 typech. Ty se rozlišují na základě antigenních charakteristik toxinu a označují se písmeny A až G. Typy toxinů A, B a E jsou pro člověka patogenní. Toxiny typu C, D a E způsobují onemocnění u ptáků, savců a ryb. Botulotoxin je bezbarvý, bez vůně a chuti. Je to nejtoxičtější látka na světě. Už 30 ng/kg se bere jako toxická dávka a 400 g toxinu je schopno zabít celou lidskou populaci. Fungování botulotoxinu je založeno na blokaci uvolňování acetylcholinu na neuromuskulárních spojích nervů u kosterního svalstva a periferních cholinergních autonomních synapsích. Botulotoxin se váže ireverzibilně na presynaptické receptory, a tím způsobuje inhibici uvolnění acetylcholinu (Nováková, 2017).

Pro tyto bakterie je typický tzv. alimentární botulismus způsobený pozřením toxinu v potravě, ale v některých případech mohou spory kontaminovat ránu. Poté hovoříme o tzv. traumatickém (ranném) botulismu, jehož výskyt je pozorován hlavně u narkomanů (Votava a kol., 2003). U ranného botulismu pozorujeme stejné symptomy jako při otravě

z potravin, ale inkubační době je delší (4 dny a více). Gastrointestinální příznaky jsou ojedinělé (Nováková, 2017).

1.4.2.3 Detekce *Clostridium botulinum*

Komplex botulinového neurotoxinu (BoNT) je tvořen syntézou botulotoxického neurotoxinu a v závislosti na sérotypu, dvěma až šesti netoxickými proteiny asociovanými s neurotoxinem (NAP). Neurotoxin poté chrání komplex botulinového neurotoxinu před kyselým prostředím a proteázami gastrointestinálního traktu. Vhodnou metodou pro detekci tohoto mikroorganismu je metoda ELISA. Test využívá toxinové specifické polyklonální protilátky pro zachycení toxinů a polyklonální protilátky specifické pro typ toxinu, který je značený digoxigeninem jako sekundární protilátka. Tyto DIG značené sekundární protilátky jsou detekovány anti-DIG protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou. Mezi zlatý standard detekce toxinů a sérotypizace patří biologický pokus myši, od kterého se ovšem upouští (Sharma et al., 2006). U botulismu v ranách se používají stejné metody detekce. Tento druh botulismu se vyskytuje u drogově závislých pacientů (Werner et al., 2000).

1.4.2.4 Identifikace *Clostridium botulinum*

Klasické komerční biochemické testy selhávají při identifikaci tohoto mikroba, proto se využívá technika PCR, která nabízí vysokou citlivost a specifitu při identifikaci. Dále se k identifikaci používají kultivační média. *C. botulinum* vyžaduje přísně anaerobní prostředí pro růst, a proto musí být všechna média zbavena kyslíku. K udržení anaerobního prostředí se využívá thioglykolát. Mezi rutinní kapalná média patří masové médium s glukózou a škrobem, a také média obohacená o různé kombinace peptonu, glukózy a kvasničného extraktu. EYA (krycí agar s vaječným žloutkem) slouží jako nejběžnější neselektivní médium a umožňuje lipázovou reakci typickou pro *C. botulinum* (Lindstrom et al., 2006). Jako selektivní médium se využívá CBI (Clostridium Botulinum Isolation) agar nebo BSM (Bifidus Selective Medium) agar (García et al., 2001).

1.4.2.5 Citlivost na ATB *Clostridium botulinum*

U raného botulismu se v prvních 24 hodinách doporučuje léčba trivalentním antitoxinem (A, B, E), než lékař dostane výsledky z laboratoře. Pro pacienta je nejúčinnější léčbou chirurgický zákrok, odstranění mikroba z rány a následné zaléčení pomocí ATB. Tento mikrob je citlivý na metronidazol a penicilin (Schulte et al., 2017).

1.4.3 *Clostridium tetani*

1.4.3.1 Mikrobiologická charakteristika *Clostridium tetani*

Clostridium tetani patří mezi sporulující a anaerobní tyčinky, které jsou pohyblivé. Produkuje neurotoxin vyvolávající tetanus neboli strnutí šíje. Vegetativní forma se vyznačuje relativně štíhlými grampozitivními tyčinkami o rozměrech 0,5x5-7 µm, zatímco spory jsou okrouhlé a vysoce rezistentní. Umístění spor je terminální, což se jeví v mikroskopu jako kyjovité tyčinky (Votava a kol., 2003).

1.4.3.2 Patogenita a virulence *Clostridium tetani*

Obvyklý způsob vzniku infekce *C. tetani* je hluboká rána ve tkáni, do které se dostanou půdou nebo fekálními látkami spory. Anaerobní prostředí v nekrotizující tkáni poskytuje vhodné prostředí pro replikaci bakterií. Bakterie replikující se v ráně vylučují tetanolyzin a tetanový neurotoxin. Tetanolyzin optimalizuje podmínky v ráně, zatímco tetanový neurotoxin je jeden z nejsilnějších neurotoxinů. Jeho účinky na centrální nervovou soustavu způsobují klinický tetanus (Campbell, 2009).

1.4.3.3 Detekce *Clostridium tetani*

C. tetani je detekován na základě nukleotidové sekvence genu kódujícího tetanový toxin a kódování jeho přímého transkripčního aktivátoru. K detekci lze využít elektroforézu v gelu s pulsním polem. Dále lze využít metodu PCR (Plourde-Owobi et al., 2005).

1.4.3.4 Identifikace *Clostridium tetani*

Tampony pacientů byly inokulovány na Petriho misky s krevním agarem bez přítomnosti kyslíku. Krevní agar obsahoval 10 % ovčí krve. Dále byl použit MacConkey agar. *C. tetani* byl identifikován na základě Gramova barvení, citlivostí na metronidazol a morfologií kolonií. Nefermentuje sacharidy, ale na MacConkey agaru produkuje nazelenalou fluorescenci (Campbell, 2009).

1.4.3.5 Citlivost na ATB *Clostridium tetani*

Pro léčbu tetanu způsobeného mikroorganismem *C. tetani* se využívá penicilin a metronidazol, avšak na ko-trimoxazol je tento mikrob rezistentní. Prevence je dána správnou vakcinací (Thwaites et al., 2015)

1.4.4 *Clostridium perfringens*

1.4.4.1 Mikrobiologická charakteristika *Clostridium perfringens*

Vegetativní buňky jsou grampozitivní, nepohyblivé a poměrně silné tyčinky různé délky. U těchto mikroorganismů se někdy můžeme setkat s polysacharidovým pouzdem. Ve střevě poté probíhá tvorba oválných, subterminálních spor. *C. perfringens* řadíme k částečně aerotolerantním příslušníkům rodu. Aerotoleranci (růst za přítomnosti kyslíku) umožňuje enzym peroxidáza (Votava a kol., 2003).

Clostridium perfringens typ A řadíme spolu s *Clostridium novyi* typ A a *Clostridium septicum* do skupiny klostridií anaerobních traumatóz. Tito zástupci nejčastěji způsobují infekce měkkých tkání. Jako další klostridia podílející se na těchto infekcích můžeme uvést *C. histolyticum*, *C. sporogenes*, *C. tertium*, *C. sordelii* a *C. fallax*. Infekce působené těmito bakteriemi jsou většinou smíšené (Votava a kol., 2003).

Řazení infekcí do 3 skupin dle spektra klinických projevů. V první skupině se klostridia chovají jako pyogenní patogeny, nedostávají se do měkkých tkání a nejsou pozorovány příznaky spolupůsobení toxinů. Do druhé skupiny patří lokalizované hnisavě-nekrotické procesy s lokálním účinkem toxinů klostridií. Postižení vně fascie je epifasciální klostridiová flegmóza. Postižení fascie je nekrotizující fascilitida. Poslední skupina zahrnuje vysoce invazivní, nekrotizující procesy s celkovou intoxikací, jako je klostridiová celulitida, kdy je poškozena tkáň kůže a podkoží. Když se přidá difúzně se šířící nekróza kůže, podkoží a svalstva, mluvíme o tzv. plynaté sněti (Votava a kol., 2003).

1.4.4.2 Patogenita a virulence *Clostridium perfringens*

Obvyklým projevem infekce *C. perfringens* je myonekróza nebo fasciitida. Tato infekce může postihnout i CNS a způsobit onemocnění nervové soustavy, meningitidu, encefalitidu nebo cerebrální absces. Dále mohou infekce postihnout gastrointestinální trakt nebo způsobit urogenitální potíže. Toxiny jsou hlavními faktory virulence. Alfa-toxin neboli CPE (*C. perfringens* enterotoxin) s aktivitou lecitinázy a sfingomyelinázy obsahuje N-terminální doménu a C-terminální doménu, potřebnou pro interakci s vápenatými ionty. Mezi jeho biologické aktivity patří větší propustnost kapilár, indukuje agregaci krevních destiček, myonekrózu, snížení srdeční kontrakility a smrt (Gyles et al., 2010).

1.4.4.3 Detekce *Clostridium perfringens*

Vedle CPE produkuje *C. perfringens* ještě dalších 11 extracelulárních toxinů a v poslední době byl objeven ještě nový toxin, nazývaný beta-2-toxin. Detekce se provádí pomocí neutralizace biologické aktivity v kůži myši anebo nově metodou PCR. V průběhu let

pak byla navržena řada sérologických metod, včetně elektroimunodifúze, reverzní pasivní hemaglutinace, fluorescenčních protilátek a difúze do gelů, které detekují enterotoxin *C. perfringens*. V současné době se nejvíce používá metoda ELISA a pasivní latexová aglutinace (Labbe et al., 2006)

1.4.4.4 Identifikace *Clostridium perfringens*

Pro identifikaci *C. perfringens* se využívá TSC agar s tryptózou, siřičitanem a cykloserinem, na kterém roste *C. perfringens* v černých koloniích. Nedávno byla vyzkoušena nová média pro kultivaci klostridií, a to BCP (*Bacillus cereus*/*Clostridium perfringens*) agar, což je médium s vaječným žloutkem. Toto médium ovšem nebylo moc spolehlivé. Proto bylo navrženo BISC (s bismutem, železem, siřičitanem a cykloserinem) jako médium selektivní pro izolaci *C. perfringens*. Na laktóza-žloutkovém médiu se provádí test na účinnost lecitinázy (Obr. 5), kdy pozorujeme zónu opalescence kolem kolonií (Labbe et al., 2006).



Obrázek 5 Průkaz lecitinázy *C. perfringens* na Mueller-Hintonově agaru. Tento agar obsahuje přídavek žloutkové emulze (Udhayavel et al., 2017).

1.4.4.5 Citlivost na ATB *Clostridium perfringens*

Izoláty jsou citlivé na gentamicin, chlortetracyklin a na linkomycin. Zatímco nízká citlivost byla prokázána u neomycinu, kotrimazinu a bacitracinu. Všechny izolované kmeny byly rezistentní na penicilin G. Citlivost na penicilin G se liší v jednotlivých průzkumech z důvodu používání ATB v zahraničním potravinářství (Udhayavel et al., 2017).

1.4.5 *Clostridium septicum*

1.4.5.1 Mikrobiologická charakteristika *Clostridium septicum*

Clostridium septicum je pohyblivý a kultivačně nenáročný mikrob, který roste na běžných kultivačních půdách, a to v šedých koloniích s nepravidelnými okraji. Někdy u něj lze pozorovat plazivý růst a β -hemolýzu. Ačkoliv je tento mikrob anaerobní, přítomnost malého množství kyslíku v atmosféře nepůsobí letálně na vegetativní formy bakterií. Vegetativní buňky jsou poměrně variabilní, co se týče velikosti, a skládají se do řetízků. Spory jsou uloženy subterminálně (Votava a kol., 2003).

1.4.5.2 Patogenita a virulence *Clostridium septicum*

Clostridium septicum je mikrob vyvolávající plynatou gangrénu či myonekrózu. Produkce alfa-toxinu je pro tento mikroorganismus specifická a je nezbytným faktorem virulence. Tato bakterie se dostává do mukózní sliznice při jejím narušení, a to hematogenní invazí nebo pomocí nádoru. Klostridiová infekce je přítomna při maligním onemocnění z důvodu přítomnosti kyselého a hypoxického prostředí, které anaerobní glykolýza nádoru poskytuje (Mirza et al., 2009).

1.4.5.3 Detekce *Clostridium septicum*

Jako nejspolehlivější forma detekce se ukázala PCR metoda založená na DNA. Je spolehlivá, rychlá a jednoduchá. Konvenční PCR systémy se zaměřují na 16S rRNA nebo bičíkový gen. PCR v reálném čase využívá fluorescenčně značené sondy pro detekci amplikonu. Vícekanálová detekce pak umožňuje paralelní analýzu. Tato metoda navíc umožňuje rozlišení *C. chauvoei* od *C. septicum* (Halm et al., 2010).

1.4.5.4 Identifikace *Clostridium septicum*

Pod mikroskopem pozorujeme gramlabilní buňky s četnými spory uloženými subterminálně. Na krevním agaru rostou rychle a způsobují β -hemolýzu. Jsou negativní na lecitinázu, lipázu, indol a na test na ureázu. Jsou snadno rozpoznány komerčně vyráběnými biochemickými sadami. Jako novinka pro identifikaci většiny mikroorganismů se používá MALDI-TOF MS, zejména v analýze proteinového složení bakteriální buňky. Výsledky této

analýzy jsou během několika hodin (UK Standards for Microbiology Investigations, Issued by the Standards Unit, Public Health England, 2015).

1.4.5.5 Citlivost na ATB *Clostridium septicum*

Clostridium septicum je citlivý na širokou škálu antibiotik, jako je klindamycin, penicilin a metronidazol. K léčbě infekce tohoto druhu se může použít i hyperbarická kyslíková terapie, neexistuje k ní však dostatečné množství kontrolovaných studií (Mirza et al., 2009)

1.4.6 *Clostridium histolyticum*, *Clostridium sordelii*, *Clostridium sporogenes*

Clostridium histolyticum patří mezi aerotolerantní, pohyblivé, štíhlé a silně proteolytické mikroby. Produkuje toxin α , který má letální a nekrotizující účinek a způsobuje myonekrózu. Na myonekróze se podílí i řada proteáz (např. kolagenáza). Tkáně postižené nekrózou jsou měkké, rozbředlé a téměř bez plynu.

Clostridium sordelii je též pohyblivý mikrob, který štěpí proteiny i sacharidy a produkuje ureázu. Na rozdíl od *C. histolyticum* se na tvorbě myonekrózy podílí toxin β , zatímco toxicita toxinu α je zanedbatelná.

Clostridium sporogenes bývá izolován z infekčních ran a jiných polymikrobiálních infekcí. Na zvýšení invazivity a patogeneze se podílí spolu s jinými bakteriemi. Je pohyblivý a roste ve velkých koloniích s drsným povrchem a často tvoří β -hemolýzu. Jeho spory jsou termorezistentní (Votava a kol., 2003)

1.5 Grampozitivní anaerobní nesporulující tyčinky

Grampozitivní anaerobní tyčinky, které jsou nesporulující, patří ve valné většině k běžné mikroflóře lidského těla. Nalézáme je v dutině ústní, v nosohltanu, v tlustém střevě, ve vagíně nebo na kůži. V určitých situacích dokáží vyvolat endogenní infekci nebo se na jejím vzniku alespoň podílet. Morfologie je velice rozmanitá. U těchto mikroorganismů lze pozorovat tvar tyčinek někdy až zvláštních tvarů jako např. rozštěpené či kyjovité tyčinky nebo různě dlouhá a větvená vlákna. Tato vlákna se někdy rozpadají na kokovité útvary. Ve vláknitých formách pak často dochází k vymizení barvitelnosti či gramlability (Votava a kol., 2003).

1.5.1 Rod *Actinomyces*

1.5.1.1 Mikrobiologická charakteristika rodu *Actinomyces*

Rod *Actinomyces* dle taxonomie spadá do čeledi *Actinomycetaceae*. Bakterie rodu *Actinomyces* jsou grampozitivní, anaerobní, nesporulující, nepohyblivé a mají tendenci

vytvářejí větvené tyčinky a větvená vlákna. Mají také fermentační typ metabolismu uhlohydrátů. Doposud bylo popsáno více než 30 druhů rodu *Actinomyces*, z nichž je alespoň polovina patogenní pro člověka (*Actinomyces species* – Antimicrobe, 2002).

1.5.1.2 Patogenita a virulence rodu *Actinomyces*

Aktinomycety se běžně nacházejí v dutině ústní a urogenitálním traktu. Vzniklé infekce poté souvisejí s těmito místy. Určitou roli hrají při parodontitidě a u zubních granulomů. Nejvýznamnější je jejich účast na vzniku aktinomykózy, kdy vznikají abscesy a píštěle, ze kterých vytéká hnis obsahující shluky mikrobů nazývané drúzy (Votava a kol., 2003). Aktinomycety získávají přístup k hlubším tkáním při chirurgických zákrocích, při traumatu nebo pomocí cizích těles, které narušují mukózní bariéru. Nevytvářejí klasické exotoxiny a determinanty virulence nejsou podrobně známy. Předpokládá se, že mají schopnost vyhnout se imunitnímu systému člověka (Kononen et al., 2015).

1.5.1.3 Detekce rodu *Actinomyces*

Pro detekci se nejvíce využívá polymerázová řetězová reakce (PCR) se specifickými primery. Mezi klasické metody detekce se řadí detekce granul se sírou nebo histologické barvení. Potvrzení diagnózy závisí na mikrobiologické kultivaci. Ke studii klasických druhů *Actinomyces* byla také použita technika DNA-DNA hybridizace (Hall, 2008).

1.5.1.4 Identifikace rodu *Actinomyces*

U tohoto mikroorganismu by mělo být provedeno přímé mikroskopické vyšetření vzorku, kdy pod mikroskopem pozorujeme grampozitivní rozvětřující se vlákna. Dále také pozorujeme zrna síry, která jsou pro aktinomykózu charakteristická. Identifikaci lze provést i konvenčními biochemickými testy, ale kmeny občas vykazují irelevantní a falešně negativní výsledky. Nejvíce využívaná metoda je PCR analýza se sekvencí 16S rRNA a bakteriální identifikační metoda založená na hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF MS (Kononen et al., 2015)

1.5.1.5 Citlivost na ATB rodu *Actinomyces*

Druhy *Actinomyces* jsou citlivé na penicilin a další beta-laktamová antibiotika. Rezistentní jsou vůči metronidazolu a klindamycinu (Kononen et al., 2015)

1.5.1.6 Tvorba biofilmu rodu *Actinomyces*

Aktinomycety se nacházejí v polymikrobiálních infekcích a hrají důležitou roli při tvorbě zubního plaku. Jsou to časté kolonizátory a integrují s řadou dalších mikroorganismů, jako je *Fusobacterium*, *Prevotella* a *Veillonella* a vzniká strukturní integrita

plaku. Jakmile vznikne biofilm v přítomnosti fermentovaného sacharidu, aktinomycety začnou tvořit kyseliny, což vede k zubnímu kazu (Kononen et al., 2015)

1.5.2 Rod *Propionibacterium*

1.5.2.1 Mikrobiologická charakteristika rodu *Propionibacterium*

Rod *Propionibacterium* řadíme do čeledi *Propionibacteriaceae* (NCBI, Taxonomy Browser, [b.r.]). Tento rod je anaerobní obdobou rodu *Corynebacterium*. Z morfologického hlediska se jedná o grampozitivní tyčinky kyjovitého tvaru. Zástupci tohoto rodu obývají běžnou mikroflóru kůže, dutiny ústní a nosohltanu. Dále také gastrointestinální a urogenitální trakt. Bakterie rodu *Propionibacterium* mají schopnost produkovat lipázu, což hraje významnou roli při tvorbě akné. Jsou jedním z nejčastějších nesporelujících anaerobů nalézáných v klinickém materiálu. Nejvýznamnějším zástupcem je *Propionibacterium acnes* vyvolávající akné na obličeji (Votava a kol., 2003).

1.5.2.2 Patogenita a virulence rodu *Propionibacterium*

Propionibacterium acnes je oportunní patogen způsobující celou řadu infekcí a zánětlivých stavů. Nejvíce je spojován s acne vulgaris (poškozená funkce mazových žláz) a přispívá k zánětlivé fázi této nemoci. Infekce *Prop. acnes* bývají také spojené s chirurgickým zákrokem, traumatem nebo přítomností cizího tělesa (Perry et al., 2006).

Tabulka 2 Infekce, jejichž příčinou je *Propionibacterium acnes* (Perry et al., 2006)

Infekce	Predisponující faktor
Discitida	chirurgická operace
Spondylodiscitida	epidurální katetr
Infekce CNS	neurochirurgické zákroky
Endokarditida	umělá aortální chlopeč
Osteomyelitida	lumbální punkce
Endoftalmitida	pooperační stavy
Kloubní infekce	umělé klouby

Prop. acnes roste velmi pomalu a je odolný vůči fagocytóze, což znamená, že může přežívat intracelulárně uvnitř makrofágů. Rezistence k fagocytóze může být způsobena díky struktuře komplexních buněčných stěn organismu, která má vláknitou povrchovou vrstvu. *Prop. acnes* bylo na základě aglutinačních testů buněčné stěny a cukrů organismu rozděleno na typ I a II, přičemž typ II není schopen fermentovat sorbitol. Patogenita tohoto mikroorganismu je založena na produkci bioaktivních exocelulárních produktů a jejich interakci s imunitním

systémem. Samotný mikroorganismus může aktivovat komplement klasickou i alternativní cestou. To vede k tvorbě C5-dependetních chemotaktických faktorů (Perry et al., 2006).

1.5.2.3 Detekce rodu *Propionibacterium*

V klinických laboratořích se používají metody kultivace, sérologické testy, specifická polymerázová řetězová reakce (PCR) založená na detekci 16S rRNA a další. Avšak tyto metody jsou založeny na známých sekvencích nebo komponentách a většinou se zaměřují jen na známé patogeny, což je jejich nevýhoda. Sekvence nové generace (NGS) je nový a atraktivní nástroj pro detekci patogenů širokého spektra. Tyto sekvence mají potenciál detekovat a identifikovat různé druhy patogenů (YE et al., 2015). K detekci tohoto mikroorganismu a jeho biofilmu lze využít i metodu FISH, DAPI a imunofluorescenční mikroskopii. Tyto metody se používají pro vizualizaci *Prop. acnes* v kožních kompartmentech pacientů s akné (Alexeyev et al., 2012).

1.5.2.4 Identifikace rodu *Propionibacterium*

Tento mikrob má specifickou makroskopickou i mikroskopickou morfologii. Je kataláza pozitivní a většina kmenů je indol pozitivní. Identifikace byla prováděna konvenčními reakcemi jako je CAMP test, indol, redukce dusičnanů, kataláza a detekce kyseliny propionové jako produktu metabolismu (Bossard et al., 2016).

K identifikaci a rozdělení *Prop. acnes* je v dnešní době používána imunofluorescenční mikroskopie s použitím specifických antisér, molekulární techniky zahrnující analýzu sekvence recA a náhodná amplifikace polymorfní DNA. V laboratořích se využívá MALDI-TOF MS (Bossard et al., 2016).

1.5.2.5 Citlivost na ATB rodu *Propionibacterium*

Prop. acnes je citlivý na širokou škálu ATB a infekce se snadno léčí. Nejvyšší citlivost vykazuje tento mikroorganismus k metronidazolu, zatímco aminoglykosidy jsou jen slabě aktivní. Nejvyšší úroveň rezistence je pozorována u klindamycinu, erytromycinu a tetracyklinu. Tato rezistence je spojována s rozšířeným používáním ATB k léčbě akné (Perry et al., 2011).

1.5.2.6 Tvorba biofilmu rodu *Propionibacterium*

Prop. acnes tvoří biofilmy in vivo a in vitro u řady zdravotnických prostředků. Na tvorbě biofilmu se podílejí tři skupiny genů kódující enzymy potřebné k biosyntéze extracelulárních polysacharidů a adhezních proteinů. Produkce biofilmu může být

determinantou virulence umožňující infekce protetických prostředků. Tvorba biofilmu v pilosebaceovém folikulu funguje jako část akné zátky (Perry et al., 2011).

1.6 Grampozitivní anaerobní koky

Do této skupiny řadíme grampozitivní koky, pro něž je typický růst za anaerobních podmínek, a jsou příbuzné klostridiím. Obvykle tvoří dvojice, tetrády nebo krátké řetízky. V klinickém materiálu se nejvíce vyskytuje rod *Peptostreptococcus* (Votava a kol., 2003).

1.6.1 Rod *Peptostreptococcus*

1.6.1.1 Mikrobiologická charakteristika rodu *Peptostreptococcus*

Rod *Peptostreptococcus* řadíme do čeledi *Peptostreptococcaceae* (NCBI, Taxonomy Browser, [b.r.]). Jsou to anaerobní grampozitivní koky. Nejvyšší patogenitu v rámci rodu mají *Peptostreptococcus magnus*, *Peptostreptococcus anaerobius* a *Peptostreptococcus asaccharolyticus*. Mezi další klinicky významné druhy patří *Peptostreptococcus micros* (původce infekce dutiny ústní), *Peptostreptococcus vaginalis*, *Peptostreptococcus prevotii* a *Peptostreptococcus tetradius* (Votava a kol., 2003).

Bakterie *Pep. stomatis* jsou uspořádány ve dvojicích nebo krátkých řetízcích. Jejich kolonie jsou kruhové, neprůhledné, lesklé, krémové až bílé s úzkým šedým obvodovým prstencem. Fermentuje glukózu, fruktózu a maltózu. Mezi konečné produkty patří kyselina octová a isokapronová a menší množství kyselin izomáselných a isovalerových. Je členem orální komensální mikroflóry (Murphy et al., 2013).

Pep. anaerobius tvoří kokobacily uspořádané do krátkých řetízků. Kolonie jsou šedé s mírně vztyčeným šedým středem a rostou na obohaceném krevním agaru rychleji než ostatní mikroorganismy, čímž vyvolávají sladký zápach. Nachází se v gastrointestinální a vaginální flóře (Murphy et al., 2013).

1.6.1.2 Patogenita a virulence rodu *Peptostreptococcus*

Peptostreptokoky patří mezi patogeny tvořící infekce v horních cestách dýchacích. Tyto anaerobní streptokoky se většinou nacházejí ve smíšených aerobních či anaerobních infekcích. Způsobují infekce dýchacího traktu, měkkých tkání a dokáží vyvolat akutní zánět středního ucha, krční lymfadenitidu a akutní zánět vedlejších dutin nosních (Brook, 2017).

1.6.1.3 Detekce rodu *Peptostreptococcus*

K detekci produkce těkavých mastných kyselin se využívá kapalinová nebo plynová chromatografie. Jelikož je to velice nákladná a časově náročná technika, v klinických laboratořích se moc nepoužívá. Rychlejší alternativa pro detekci a identifikaci se nabízí PCR

technika. PCR analýza byla vyvinuta za použití primerového páru zaměřeného na 16S rRNA gen *Pep. magnus* a využita k detekci tohoto mikroba ve vzorcích subgingiválního plaku u pacientů s parodontitidou a s akutními dentoalveolárními abscesy (Riggio et al., 2003).

1.6.1.4 Identifikace rodu *Peptostreptococcus*

Identifikace jednoho z nejčastějších peptostreptokoků *Pep. magnus* je velice obtížná z důvodu špatné odlišitelnosti od *P. micros*. Použité testy jako je kultivace, produkce alkalické fosfatázy a fermentace sacharidů k identifikaci nestačí, proto se přešlo k posuzování jejich proteolytických aktivit za použití předem vytvořených enzymových kitů (Riggio et al., 2003).

1.6.1.5 Citlivost na ATB rodu *Peptostreptococcus*

Údaje o citlivosti rodu *Peptostreptococcus* na ATB nejsou příliš dostupné. Na testy citlivosti byly použity izoláty pocházející z různých klinických materiálů, jako jsou vředy, kožní vzorky, vzorky hnisavého genitourinálního traktu a gastrointestinální vzorky. Mikroorganismy pak byly testovány na různá ATB, a to amoxicilin, amoxicilin/klavulanová kyselina, cefoxitin, ertapenem, azithromycin, klindamycin, metronidazol a moxifloxacin. *Pep. stomatis* vykazuje citlivost ke všem ATB se zvýšenou citlivostí ke klindamycinu. Zatímco *Pep. anaerobius* vykazuje středně odolnou MIC vůči jednomu nebo více lékům, včetně amoxicilinu, amoxilin/kyseliny klavulanové, cefoxitinu a moxifloxacinu. Jako jeden z nejúčinnějších léků se ukázal metronidazol. Jelikož byl v jedné studii prokázán gen rezistence vůči nitroimidazolu, v budoucnu bude nutné sledovat u toho mikroorganismu rezistenci na metronidazol (Murphy et al., 2013).

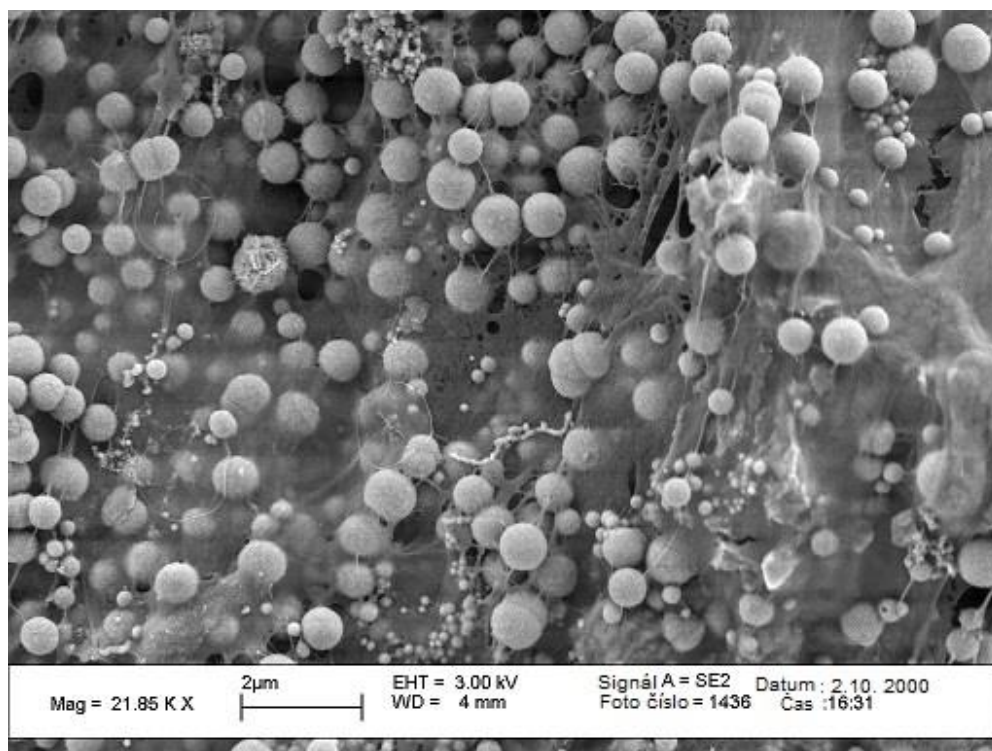
2 Biofilm

2.1 Definice biofilmu

Biofilm můžeme popsat jako sestavu mikrobiálních buněk. Tato sestava je nevratně spojena s povrchem a uzavřena v primárně polysacharidové matrici. V biofilmu lze pozorovat i částice nebakteriálního typu, jako např. minerály, částice koroze, jílů nebo krevních složek, a to v závislosti na prostředí, kde se biofilm nachází (Donlan, 2001).

U bakteriálního biofilmu dochází na úrovni genové transkripce k výrazným rozdílům ve srovnání s planktonně žijícími buňkami. Proto lze brát tvorbu biofilmu jako postupně se vyvíjející evoluční proces (Kvasničková a kol., 2016).

Bakteriální biofilmy lze tedy nalézt na širokém spektru povrchů, včetně živých tkání, vnitřních zdravotnických prostředků až po vodovodní potrubí nebo přírodní vodní systémy (Donlan, 2001). A právě tvorba biofilmu v lidských tkáních či zdravotnických prostředcích vede ke vzniku i život ohrožujících infekcí.



Obrázek 6 Bakteriální biofilm. Elektronová mikrofotografie při zvětšení 21 850 x, která ukazuje detaily povrchu biofilmu, hydratované matrice polysacharidu a bílkoviny tvořené agregáty bakterií rodu *Staphylococcus aureus* (Hilton et al., 2012).

2.2 Struktura biofilmu

Biofilm se skládá ze dvou částí, a to z mnohobuněčného společenství buněk přilnutých k povrchu a vlastní produkce EPS. Díky existenci EPS s různou hustotou je pak jednovrstevná či trojrozměrná struktura biofilmu heterogenní, tzn. nestejnorodá. EPS obecně obsahuje polysacharidy, proteiny, glykolipidy, extracelulární DNA (eDNA) a je významná pro morfologii biofilmu, jeho funkci a přežití v nepříznivých enviromentálních podmínkách. Extracelulární polymerní látky tvoří hlavní část matrix v biofilmu. K propojování polymerních vláken a zvýšení vazebné schopnosti biofilmu slouží neutrální nebo polyanionické polysacharidy, které zjednodušují sdružování dvojmocných iontů (Lin et al., 2017). EPS má na starost okamžité podmínky života buněk v biofilmu, a to ovlivněním porozity, hustoty, obsahu vody, sorpčních vlastností, náboje, hydrofobie a mechanické stability (Flemming et al., 2007).

Enzymy, které jsou přítomny v extracelulární matrix (ECM), plní funkci degradace ve vodě rozpustných i nerozpustných biopolymerů a podílí se na ochraně biofilmu před biologicky aktivními látkami (Kvasničková a kol., 2016).

Velice diskutovaným tématem je přítomnost eDNA v extracelulární matrix biofilmu. Funguje jako propojovací můstek, jak mezi buňkami, tak mezi buňkou a substrátem či jinou složkou. Štěpení eDNA pomocí DNAázy vykazuje určitou účinnost v boji proti biofilmům (Chen et al., 2018).

Takto vzniklá mikrobiální společenství jsou protkána vodními kanálky, umožňující transport esenciálních živin, kyslíku a odpadních složek k buňkám nebo od nich do okolního prostředí (Kvasničková, 2016). Podle dostupnosti živin a rozmanitosti mikrobiálních druhů rozlišujeme poté různou tloušťku biofilmu, která může dosahovat řádově až stovek mikrometrů (Watnick et al., 2000).

2.3 Výhody přežívání bakterií v biofilmu

V dnešní době existuje již několik hypotéz zabývajících se výhodami přežívání bakterií v biofilmu. Jednak jsou to povrchy, které poskytují prostor pro adhezi a určitý stupeň stability růstu. Můžou však mít i katalytické funkce díky lokalizaci buněk v těsné blízkosti. Další výhoda je ochrana před působením různých nežádoucích vlivů jako např. UV záření, toxicita způsobená kovy a působení kyselin. Také chrání bakterie před dehydratací, salinitou, působením různých antimikrobiálních činidel a některých antibiotik (Hall-Stoodley et al., 2004).

Jednou z dalších velice důležitých výhod je metabolická rozmanitost u heterogenních biofilmů. Trojrozměrná struktura biofilmu má za následek difúzní limitaci. Ta pak mění dostupnost živin, pH a obsah kyslíku. Toho ovšem umí bakterie využít a využívají produkt jednoho mikroorganismu jako substrát pro jiný komenzální druh (Kvasničková a kol., 2016).

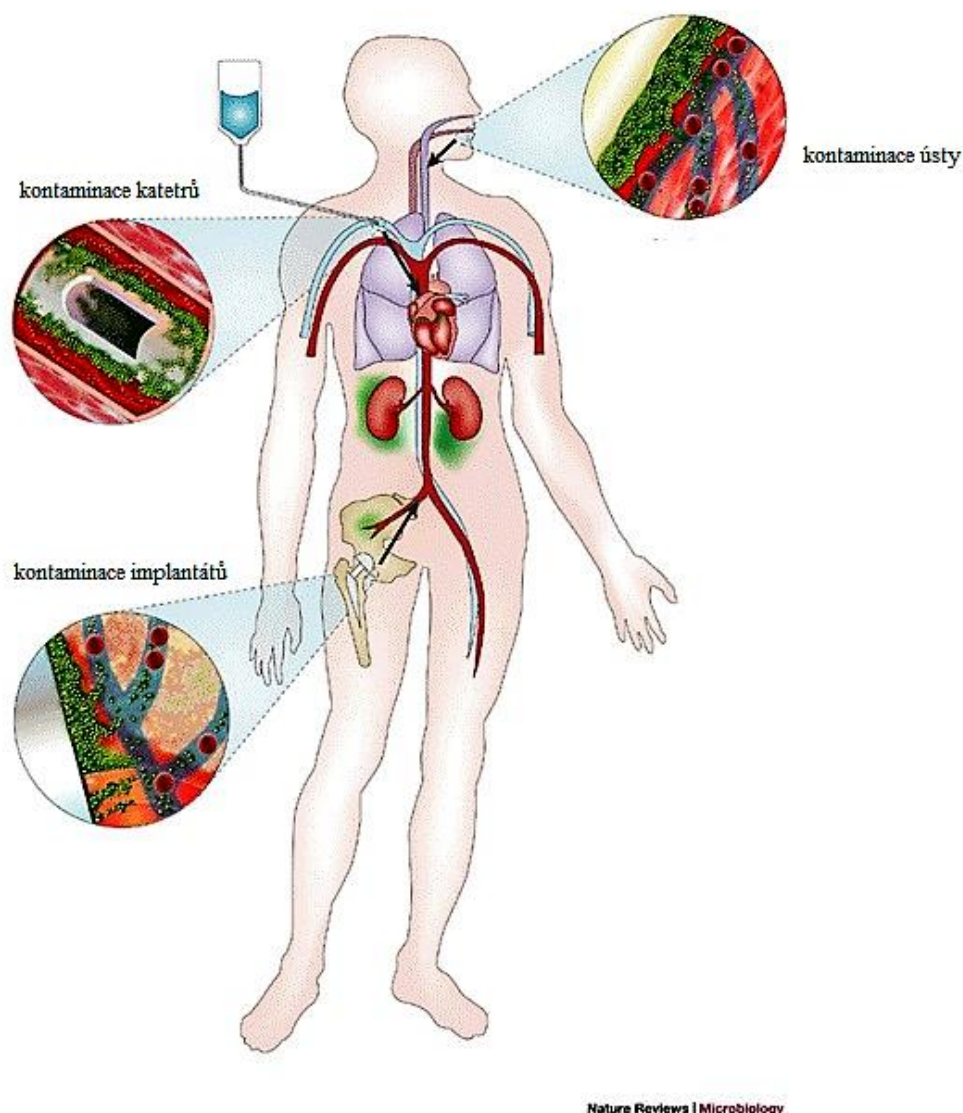
Genetickou adaptaci považujeme za jeden ze základních kamenů přežití bakterií. V rámci genetické adaptace pozorujeme různé mutace a rekombinace v rámci genů, získávání nového genetického materiálu nebo regulace už existujícího genetického materiálu. Flexibilita genové exprese umožňuje bakteriím přežít v rychle se měnícím prostředí a přežívání na většině míst celého světa. Bakterie, schopné kolonizovat lidský organismus, jsou poté obzvlášť kreativní, co se týče jejich regulačních procesů, a hlavně odolávání antimikrobiální léčby. Těmto bakteriím nevadí přechod z životního prostředí do prostředí lidského hostitele, přizpůsobují se dostupnosti živin a bojují proti primární i sekundární imunitě lidského těla (Jefferson, 2004).

2.4 Nález biofilmu v lidském organismu

Donedávna byla společnost postihnuta akutními epidemickými infekčními chorobami, se kterými se vypořádaly až vakcíny nebo antibiotika. Tyto choroby způsobovaly planktonické buňky specializovaných patogenů, jako jsou *Vibrio cholerea* nebo *Yersinia pestis*. Moderní akutní infekce dokážeme dnes léčit pomocí antibiotik a nepovažují se za biofilmové (Costerton et al., 1999).

Nicméně více než polovina infekčních onemocnění je biofilmového původu. Při prokazování biofilmového onemocnění bylo využito hlavně elektronové mikroskopie. Ta prokázala biofilmová ohniska nejen na zdravotnických prostředcích, ale i v tkáních odebraných z chronických infekcí. Tyto infekce mohou být způsobeny jedním i více druhy bakterií (Bin Abu Bakar, 2018).

Na obrázku č. 2 pozorujeme tři nejčastější formy vstupu biofilmové infekce do těla. Nejčastěji je spojována tvorba biofilmu s chronickými infekcemi plic a záněty středního ucha. Biofilmy se dále tvoří na umělých zubních či kloubních náhradách, a také na žilních katetrech, sloužících k podávání tekutin a výživy. Často se tvoří i v močových katetrech. Vznik biofilmu souvisí i s tzv. perionitidou neboli zánětem ozubice (Kvasničková a kol., 2016).



Nature Reviews | Microbiology

Obrázek 7 Cesty vstupu infekce do těla. Schematické znázornění tří možných bodů vstupu infekčního biofilmu do těla: katétr, náhrada kyčelního kloubu a periodontální onemocnění. Šipky poté ukazují, jak by mohl být infekční biofilm rozptýlen po celém těle, a to jak samostatnými buňkami, tak i shluky buněk (Hall-Stoodley et al., 2004, přepracováno 03-27-2018)

2.5 Nejčastější biofilmové infekce a jejich původci

Mikroorganismy mohou způsobovat v lidském organismu infekci a zánět, a to tak, že pronikají do kůže, resp. mukózní membrány nebo kůži, resp. mukózní membránu poškozují. Tento stav poté vede ke vzniku zánětu v organismu. V lidském těle existuje i tzv. přirozená mikroflóra. Ta se vyskytuje na kůži a sliznicích (ústa, střevní trakt, vagina a distální část močové trubice). Části slizničních membrán (např. středního ucha, vedlejších nosních dutin, respiračních zón plic, děloha atd.) přirozenou mikroflóru nemají, jsou však bakteriemi napadány (Dappa et al., 2013). Když se přirozené prostředí organismu patologicky změní, začne tělo okamžitě reagovat aktivováním obranných mechanismů.

Níže uvedená tabulka zobrazuje souhrn nejčastějších onemocnění a infekcí spojených s tvorbou biofilmu (Tabulka 3).

Tabulka 3 Biofilmová onemocnění. Částečný seznam infekcí lidského organismu zahrnujících biofilm (Costerton et al., 1999, přepracováno 03-27-2018)

Infekce nebo onemocnění	Bakteriální druhy podílející se na tomto onemocnění
zubní kaz periodontitida zánět středního ucha chronický zánět mandlí cystická fibróza endokarditida nekrotizující fasciitida infekce svalů a kostí osteomyelitida infekce žlučových cest infekční ledvinové kameny bakteriální prostatitida	Gram-pozitivní koky (<i>Streptococcus</i> sp.) Gram-negativní anaerobní ústní bakterie nestanovitelný <i>Haemophilus influenzae</i> různé druhy <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Burkholderia cepacia</i> viridující skupiny streptokoků, stafylokoků skupina A streptokoků Gram-pozitivní koky různé druhy střevní bakterie Gram-negativní tyčinky <i>Escherichia coli</i> a ostatní Gram-negativní bakterie
Infekce spojené s cizím tělesným materiálem	
kontaktní čočky stehy pneumonie spojená s plicní ventilací umělé srdeční chlopně cévní štěpy arteriovenózní umělé propojení infekce způsobené endovaskulárním katétrem mozkomíšní mok peritoneální dialýza spojená se zánětem pobřišnice infekce spojená s močovým katétrem penilní protézy ortopedické protézy IUDs	<i>P. aeruginosa</i> , Gram-pozitivní koky stafylokoky Gram-negativní tyčinky stafylokoky Gram-pozitivní koky stafylokoky stafylokoky stafylokoky různé druhy <i>E. coli</i> , Gram-negativní tyčinky stafylokoky stafylokoky <i>Actinomyces israelii</i> a ostatní

2.6 Anaerobní druhy bakterií spojené se vznikem infekcí

Infekční choroby patří mezi jediná onemocnění, v jejichž patogenезi se uplatňuje vzájemné působení mezi člověkem či zvířetem a nějakým patogenním mikroorganismem.

O vniknutí do organismu člověka rozhodují 3 faktory. Jsou to vlastnosti mikroorganismu (patogenita, virulence a odolnost proti obranným mechanismům), schopnost organismu

se proti agens bránit a množství mikroorganismu, které se dostalo do těla. Anaerobní druhy mohou vyvolávat infekci při poruše či nekróze tkáně, resp. když se dostanou na jiné místo, než je jejich přirozené, nebo při oslabení imunity daného jedince. Infekce v oblasti dýchacího ústrojí a hlavy souvisejí s flórou dutiny ústní, zatímco infekce v oblasti břišní a pánevní souvisejí s flórou ve střevech. Druhy infekce jsou také závislé na složení bakteriální flóry každého člověka a jsou individuální. Rod *Bacteroides* a *Fusobacterium* nejčastěji nalézáme v okolí úst a faryngu. V okolí distální části zažívacího traktu se nacházejí jak bakteroidy, fusobakteria, tak i klostridia (Černý, 2008).

Mezi jedny z nejdůležitějších anaerobních mikroorganismů, které se podílejí na vzniku infekce, řadíme druhy *Clostridium* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Actinomyces* spp., *Porphyromonas* spp. a jiné.

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo objasnit infekce spojené s anaerobními bakteriemi a jejich možnost tvorby biofilmu.

V první části bakalářské práci jsou popsány jednotlivé rody anaerobních bakterií, které se účastní vzniku infekce, a to jejich mikrobiologická charakteristika a taxonomické zařazení. Dále byla popsána patogenita a faktory virulence každého mikroorganismu, které jsou prioritní pro vznik dané infekce a onemocnění. Bakterie se snaží využít všech dostupných prostředků, jako např. produktů reakcí, částí svého těla, imunity hostitele či tvorby biofilmu, k přežití a rozmnožování uvnitř hostitele.

K první části práce patří i detekce a identifikace mikroorganismů. V běžných laboratorních praxích se využívají metody kultivace na selektivní či neselektivní média, biochemické testy, které jsou komerčně dodávány jednotlivými firmami nebo různé citlivější metody, mezi které patří hlavně metoda PCR, MALDI-TOF MS či ELISA. Tyto metody však nejsou z důvodu vysokých nákladů dostupné pro všechny laboratoře.

U každého mikroorganismu byla také popsána citlivost na antibiotika. Citlivosti na antibiotika se využívá hlavně v identifikaci mikroba a při volbě léčby dané infekce či onemocnění. V současné době se však zvyšuje schopnost rezistence vůči antibiotikům u jednotlivých mikroorganismů, a to z důvodu dřívějšího používání antibiotik v potravinářství a nadměrného používání při léčbě banálních nemocí. Lékaři a výzkumní pracovníci se obávají rezistence bakterií vůči antibiotikům a stále hledají nová složení antibiotik či jiné metody léčby onemocnění, aby nedošlo k pandemickému rozšíření nemoci. Otázka antibiotik bude v budoucnu ještě hodně diskutována.

Druhá část bakalářské práce se zabývá tvorbou biofilmu jako takového. Biofilm, který můžeme popsat jako strukturu mikrobiálních buněk přilnutou k nějakému povrchu a obalenou matricí, slouží především k ochraně a přežití mikroorganismu. Biofilmy jsou buď jednodruhové či smíšené. Ve smíšených biofilmech funguje princip kooperace, kdy činnost jednoho mikroorganismu podporuje růst druhého mikroorganismu a naopak. Tento stav je pro bakterie velice výhodný a chrání je před nepříznivými podmínkami a následným usmrcením. Tvorba biofilmu se stává středem pozornosti výzkumníků na celém světě, jelikož se stále objevují nové funkce jednotlivých procesů uvnitř biofilmu a roste díky nim rezistence vůči antibiotikům.

Seznam použité literatury

- 1) Actinomyces species (Actinomycoses). Infectious Disease and Antimicrobial Agents. *Infectious Disease and Antimicrobial Agents* [online]. Copyright © [cit. 2018-03-31]. Dostupné z: <http://www.antimicrobe.org/b73.asp>.
- 2) ALEXEYEV, O.A. a A.C. JAHNS, 2012. Sampling and detection of skin *Propionibacterium acnes*: Current status. *Anaerobe*. 18(5), s. 479-483.
- 3) Antibiotic use in dental practice: A review. [online]. A review. [cit. 05-12-2018] Dostupné z: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S169869462007000300002&script=sci_arttext&tlng=pt
- 4) Atlas of anaerobes, 2016. [online]. Copyright © [cit. 04.05.2018]. Dostupné z: <https://www.tuyenlab.net/2016/09/microbiology-atlas-of-anaerobes-of.html>
- 5) BARBOSA, G. M. A. V. COLOMBO, P. H. RODRIGUES et al., 2015. Intraspecies Variability Affects Heterotypic Biofilms of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*: Evidences of Strain-Dependence Biofilm Modulation by Physical Contact and by Released Soluble Factors. 10(9), s. 1-14.
- 6) BARTLETT, G., J., 1987. Anaerobic bacterial infection of the lung. *Chest*. 91(6), s. 901-909.
- 7) BARTLETT, G., J., 1993. Anaerobic bacterial infections of the lung and pleural space. *Clinical infectious diseases*. 16(4), s. 248-255.
- 8) BEDNÁŘ, M., V. FRAŇKOVÁ, J. SCHINDLER a kol., 1996. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Praha: *Marvil*, ISBN 9788023802979.
- 9) BIN ABU BAKAR, M., J. MCKIMM and M. HAQUE, 2018, Otitis media and biofilm: An overview. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Disease*. 8(3), s. 70-78.
- 10) BOSSARD, D. A., B. LEDERBERGER, P. O. ZINGG et al., 2016. Optimal Length of Cultivation Time for Isolation of *Propionibacterium acnes* in Suspected Bone and Joint Infections Is More than 7 Days. *Journal of Clinical Microbiology*[online]. 2016, 54(12), s. 1-35.
- 11) BOUTAGA, K., A. J. VAN WINKELHOOF, CH. M. J. E. VANDENBROUCKE-GRAULS et al., 2003. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *Journal of clinical mikrobiology*. 41(11), s. 4950-4954.

- 12) BRAZIER, J. S., 2006. Human infections with *Fusobacterium necrophorum*. *Anaerobe*. 12(4), s. 165-172
- 13) BROOK, I., 2007. The role of anaerobic bacteria in upper respiratory tract and other head and neck infections. *Current infectious disease reports*. 9(3), s. 208-217.
- 14) COSTERTON, J. W., P. S. STEWART a P. E. GREENBERG, 1999. Bacterial Biofilm: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*. 5418(284), s. 1318-1322.
- 15) CSOLLEYOVÁ, E., Š., JACÁK a M. CZIRFUSOVÁ, 2017. Anaeróbne infekcie mäkkých tkanív. *NEWSLAB*. 8(2). s. 100-109.
- 16) ČERNÝ, Z., 2008. Infekční nemoci: jak pečovat o pacienty s infekčním onemocněním. Vyd. 2., přeprac. a rozš. Brno: *Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně*, ISBN 978-80-7013-480-1.
- 17) DAPPA, T. and M. UNNIKRISHNAN, 2013. Biofilm formation by *Clostridium difficile*. *Gut Microbes*. 4(5). s. 397-402.
- 18) DONLAN, R. M., 2002. Biofilm: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 8(9), s. 881-890.
- 19) ECKERT, C., B. BURGHOFFER, V. LALANDE et al., 2013. Evaluation of the Chromogenic Agar chromID *C. difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*. 51(3), s. 1002-1004.
- 20) ENERSEN, M., K. NAKANO and A. AMANO, 2013. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Journal of Oral Microbiology*. 5(1), 20265.
- 21) FALAGAS, M. E. and E. SIAKAVELLAS, 2000. *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* species: a review of antibiotic resistance and therapeutic options. *International journal of antimicrobial agents*. 15(1), s. 1-9.
- 22) FENG, Z., W. LONG, B. HAO et al., 2017. A human stool-derived *Bilophila wadsworthia* strain caused systemic inflammation in specific-pathogen-free mice. *Gut Pathogens*. 9(1), s. 1-10.
- 23) FLEMMING, H. C., T. R. NEU and D. J. WOZNIAK, 2007. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *Journal of bacteriology*, 189(22), s. 7945-7947.
- 24) FUX, C. A., J. W. COSTERTON, P. S. STEWART et al., 2015 Survival strategies of infectious biofilms. *TRENDS in Microbiology*. 13(1), s. 35-40.
- 25) GERITS, E., N. VERSTRAETEN and J. MICHIELS, 2017. New approaches to combat *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *Journal of Oral Microbiology*. 9(1), 1300366, s. 1-11.
- 26) GRIFFEN, A. L., S. R. LIONS, M. R. BECKER et al., 1999. *Porphyromonas gingivalis* strain variability and periodontitis. *Journal of clinical mikrobiology*. 37(12), s. 4028-4033.

- 27) GYLES, L., C., J. F. PRESCOTT, G. SONGER et al., 2010. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4th ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell. s. 1-664. ISBN 9780470958209.
- 28) HALL, Val, 2008. Actinomyces—Gathering evidence of human colonization and infection. *Anaerobe*. 14(1), s. 1-7.
- 29) HALL-STOODLEY, L., J. W. COSTERTON and P. STOODLEY, 2004. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. 2(2), s. 95-108. ISSN 1740-1526.
- 30) HALM, A., M. WAGNER, I. HEIN et al., 2010. Novel Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection and Differentiation of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* in Clostridial Myonecrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(4), s. 1093-1098.
- 31) HILTON, L. and J. JUTZ, 2012. Biofilm – What are they and how do we prevent them. BloomingtonMN. Dostupné z: <https://www.bloomingtonmn.gov/sites/default/files/Biofilms-WhatTheyRandPrevention.pdf>. [cit. 2018-03-31].
- 32) HOLT, S. C., L. KESAVALU, S. WALKER et al., 1999. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology* 2000, 20(1), s. 168-238.
- 33) HOW, K., K. P. SONG and K. G. CHAN, 2016. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Frontiers in Microbiology*. 7, ISSN 1664 - 302X.
- 34) HOYLES, L., 2015. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Chichester, UK: John Wiley & Sons. s. 1-22.
- 35) CHEN, Z., Z. WANG, J. REN et al., 2018. Enzyme Mimicry for Combating Bacteria and Biofilms. *Accounts of Chemical Research*, 51(3), s. 789-799.
- 36) Identification of *Clostridium* species, 2015. UK Standards for Microbiology Investigations, Issued by the Standards Unit, *Public Health England*. 8(4), s. 1-27. [cit. 05-14-2018] Dostupné z: file:///C:/Users/Admin/Downloads/identification_of_clostridium_species.pdf.
- 37) JEFFERSON, K. K., 2004. What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS Microbiology Letters*. 236, s. 163–173.
- 38) JENSEN, A., L. H. KRISTENSEN and J. PRAG, 2007. Detection of *Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme* in tonsillitis in young adults by real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection*. 13(7), s. 695-701.
- 39) JINDRÁK, V., D. HEDLOVÁ a P. URBÁŠKOVÁ, 2014. Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici. Praha: Mladá fronta, *Aeskulap*, s. 1-712. ISBN 978-80-204-2815-8.

- 40) KATO, H., Y. TAGUCHI, K. TOMINAGA et al., 2014. *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. *Archives of oral biology*. 59(2), s. 167-175.
- 41) KÖNÖNEN, E. and W. G. WADE, 2015. *Actinomyces* and Related Organisms in Human Infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 28(2), s. 419-442.
- 42) KURIYAMA, T., D. W. WILLIAMS, M. YANAGISAWA et al., 2007. Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiology and Immunology*. 22(4), s. 285-288.
- 43) KVASNIČKOVÁ, E., M. PALDRYCHOVÁ, O. MAŽÁTKOVÁ a kol., 2016. Medicinal Aspects of Microbial Biofilm. *Chemické listy*, Praha: Česká společnost chemická, 110, s. 480- 490.
- 44) LABBÉ, R. G. and S. GARCÍA, 2001. Guide to foodborne pathogens. New York: Wiley, s. 82. ISBN 0471350346.
- 45) LABBE, R. G. and V. K. JUNEJA, 2013. *Clostridium perfringens* gastroenteritis. In: *Foodborne Infections and Intoxications (Fourth Edition)*. s. 137-164.
- 46) Laboratory News Network: Rapid identification of clinically significant micro-organism, 2010, [online]. *Laboratory News Network*. [cit. 04-20-2018]. Dostupné z: <http://labnewsnetwork.blogspot.cz/2010/09/rapid-identification-of-clinically.html>
- 47) LAUE, H. et al., 2006. Identification of *Bilophila wadsworthia* by specific PCR which targets the taurine: pyruvate aminotransferase gene. *FEMS Microbiology Letters*. 261(1),
- 48) LESSA, F. C., C. V. GOULD and L. C. MCDONALD, 2012. Current Status of *Clostridium difficile* Infection Epidemiology. *Clinical Infectious Diseases*. 55(2), s. 65-70.
- 49) LIN, S. et al., 2017. Pathogenic features and characteristics of food borne pathogens biofilm: Biomass, viability and matrix. *Microbial Pathogenesis*. 111, s. 285-291.
- 50) LINDSTROM, M. and H. KORKEALA, 2006. Laboratory Diagnostics of Botulism. *Clinical Microbiology Reviews*. 19(2), s. 298-314.
- 51) LONGO, D. L., D. A. LEFFLER and J. T. LAMONT, 2015. *Clostridium difficile* Infection. *New England Journal of Medicine*. 372(16), s. 1539-1548.
- 52) MACHADO DE OLIVEIRA, J. C., T. G. V. GAMA, J. F. SIQUEIRA et al., 2007. On the use of denaturing gradient gel electrophoresis approach for bacterial identification in endodontic infections. *Clinical Oral Investigations*. 11(2), s. 127-132.
- 53) MACHADO, A. and N. CERCA, 2015. Influence of Biofilm Formation by *Gardnerella vaginalis* and Other Anaerobes on Bacterial Vaginosis. *Journal of Infectious Diseases*. 212(12), s. 1856-1861.

- 54) MARRIOTT, D., D. STARK and J. HARKNESS, 2007. *Veillonella parvula* Discitis and Secondary Bacteremia: a Rare Infection Complicating Endoscopy and Colonoscopy?. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(2), s. 672-674.
- 55) MIRZA, N. N., J. M. MCCLOUD and M. J. CHEETHAM, 2009. *Clostridium septicum* sepsis and colorectal cancer – a reminder. *World Journal of Surgical Oncology*. 7(1), s. 1-4.
- 56) MURPHY, E. C. and I. M. FRICK, 2013 Gram-positive anaerobic cocci – commensals and opportunistic pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*. 37(4), s. 520-553.
- 57) NAGANO, Y., M. WATABE, K. G. PORTET et al., 2007. Development of a genus-specific PCR assay for the molecular detection, confirmation and identification of fusobacterium spp. *British Journal of Biomedical Science*, 64(2), s. 74-7.
- 58) NAGARAJA, T. G., S. K. NARAYANAN, G. C. STEWART et al., 2005. *Fusobacterium necrophorum* infections in animals: pathogenesis and pathogenic mechanisms. *Anaerobe*. 11(4), s. 239-246.
- 59) NCBI – Home – Taxonomy. National Center for Biotechnology Information [online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>. [cit. 2018-03-31].
- 60) NOVÁKOVÁ, E., 2017. *Clostridium botulinum*. *Revue Medicíny v praxi*. 15(3), s. 1-4.
- 61) NWAOKORIE, F. O., A. O. COKER, F. T. OGUNSOLA et al., 2011. Isolation and Molecular Identification of *Fusobacterium nucleatum* from Nigerian Patients with oro-facial infections. *West African journal of medicine*. 30(2), s. 126-129.
- 62) PERIASAMY, S. and P. E. KOLENBRANDER, 2009. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Builds Mutualistic Biofilm Communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* Species in Saliva. *Infection and Immunity*. 77(9), s. 3542-3551.
- 63) PERIASAMY, S. and P. E. KOLENBRANDER. 2009. Mutualistic Biofilm Communities Develop with *Porphyromonas gingivalis* and Initial, Early, and Late Colonizers of Enamel. *Journal of Bacteriology*. 191(22), s. 6804-6811.
- 64) PERRY, A. and P. LAMBERT, 2006. *Propionibacterium acnes*. *Letters in Applied Microbiology*. 42(3), s. 185-188.
- 65) PERRY, A., and P. LAMBERT, 2011. *Propionibacterium acnes*: Infection beyond the skin. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 9(12), s. 1149-1156.
- 66) PLOURDE-OWOBI, L., D. SEGUIN, M. A. BAUDIN et al., 2005. Molecular Characterization of *Clostridium tetani* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Colony PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(9), s. 5604-5606.

- 67) RAJAKARUNA, G. A., M. NEGI, K. UCHIDA et al., 2018. Localization and density of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in gingival and subgingival granulation tissues affected by chronic or aggressive periodontitis. *Scientific Reports*. 8(1), s. 9507.
- 68) RIGGIO, M. P and A. LENNON, 2003. Specific PCR detection of *Peptostreptococcus magnus*. *Journal of Medical Microbiology*. 52(4), s. 309-313.
- 69) ROBERTS, G. L., 2000. Fusobacterial infections: An underestimated threat. *British Journal of Biomedical Science*, 57(2), s. 156-62.
- 70) SANZ, M., L. LAU, D. HERRERA et al., 2004. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *Journal of Clinical Periodontology*. 31(12), s. 1034-1047.
- 71) SHARMA, S. K., J. L. FERREIRA, B. S. EBLEN et al., 2006. Detection of Type A, B, E, and F *Clostridium botulinum* Neurotoxins in Foods by Using an Amplified Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Digoxigenin-Labeled Antibodies. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(2), s. 1231-1238.
- 72) SHETAB, R., S. H. COHEN, T. PRINDIVILLE et al., 1998. Detection of *Bacteroides fragilis* Enterotoxin Gene by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(6), s. 1729–1732.
- 73) SCHULTE, M., U. HAMSEN, T. A. SCHILDHAUER et al., 2017. Effective and rapid treatment of wound botulism, a case report. *BMC Surgery*. 17(1), s. 1-3.
- 74) SMITS, W. K., D. LYRAS, D. B. LACY et al., 2016. *Clostridium difficile* infection. *Nature Reviews Disease Primers*. 2, s. 1-20.
- 75) STOODLEY, P., J. D. BOYLE, I. DODDS et al., 1997. Consensus model of biofilm structure. In: *Biofilms: community interactions and control: contributions made at Third Meeting of the British Biofilm Club held at Gregynog Hall, Powys 26-28, Cardiff*. Bioline for the British Biofilm Club. ISBN 0952043254.
- 76) THAPA, T., R. LEUZZI, K. N. YEN et al., 2013. Multiple Factors Modulate Biofilm Formation by the Anaerobic Pathogen *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology*. 195(3), s. 545-555.
- 77) THWAITES, C. L., N. J. BEECHING and Ch. R. NEWTON, 2015. Maternal and neonatal tetanus. *The Lancet*. 385(9965), s. 1-20.
- 78) TICEHURST, J. R., D. Z. AIRD, L. M. BOREK et al., 2006. Effective Detection of Toxigenic *Clostridium difficile* by a Two-Step Algorithm Including Tests for Antigen and Cytotoxin. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(3), s. 1145-1149.

- 79) TOMAZINHO, L. F. and M. J. AVILA-CAMPOS, 2007. Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in chronic endodontic infection. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 103(2), s. 285-288.
- 80) UDHAYAVEL, S., G. T. RAMASAMY, V. GOWTHAMAN et al., 2017. Occurrence of *Clostridium perfringens* contamination in poultry feed ingredients: Isolation, identification and its antibiotic sensitivity pattern. *Animal Nutrition*. 3(3), s. 309-312.
- 81) URBAN, E., A. HORTOBÁGYI, K. SZENTPÁLI et al., 2004. Two intriguing *Bilophila wadsworthia* cases from Hungary. *Journal of Medical Microbiology*. 53(11), s. 1167-1169.
- 82) VOTAVA, M. a kol., 2003. Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: NEPTUN. 495 stran. ISBN 80-902896-6-5.
- 83) WATNICK, P. and R. KOLTER, 2000. Biofilm, City of Microbes. *Journal of bacteriology*, 182(10), s. 2675-2679.
- 84) WERNER, S., D. PASSARO, J. MCGEE et al., 2000. Wound Botulism in California, 1951–1998: Recent Epidemic in Heroin Injectors. *Clinical Infectious Diseases*. 31(4), s. 1018-1024.
- 85) WEXLER, H. M., 2007. *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clinical Microbiology Reviews*. 20(4), s. 593-621
- 86) YE, M., W. WEI, Z. YANG et al., 2015. Rapid diagnosis of *Propionibacterium acnes* infection in patient with hyperpyrexia after hematopoietic stem cell transplantation by next-generation sequencing: a case report. *BMC Infectious Diseases*. 16(1), s. 1-9.
- 87) YILMAZ, O., P. VERBEKE, R. J. LAMONT et al., 2005. Intercellular Spreading of *Porphyromonas gingivalis* Infection in Primary Gingival Epithelial Cells. *Infection and Immunity*. 74(1), s 703-710.
- 88) ZHOUX, X. and Y. Li, 2015. Atlas of Oral Microbiology, from healthy mikroflora to disease. *Elsevier*, s. 41-65. ISBN 9780128022344.