

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

MIKROFLÓRA GENITÁLNÍHO ÚSTROJÍ ŽEN

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Kamila Synková

VEDOUCÍ PRÁCE: Doc. MVDr. Jaroslava Mazurová, CSc.

2008

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd
Akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kamila SYNKOVÁ**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

Název tématu: **Mikroflóra genitálního ústrojí žen**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracujte literární rešerši na zadané téma.
2. Proveďte bakteriologické vyšetření stěrů z krčku děložního žen, včetně průkazu *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* kultivačními metodami a komerčními sety *Mycoplasma DUO*.
3. Získané nálezy vyhodnoťte. Porovnejte výsledky obou metod použitých k diagnostice mykoplazmat a zdůvodněte případné nesrovnalosti.
4. Své poznatky diskutujte s publikovanými údaji.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
podle pokynu vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce: **doc. MVDr. Jaroslava Mazurová, CSc.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Markéta Vydržalová**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **1. října 2007**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2008**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2008

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala Doc. MVDr. Jaroslavě Mazurové, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce a cenné rady při jejím zpracování. Zároveň bych ráda poděkovala Mgr. Markétě Vyržalové za celkovou a obětavou spolupráci na tomto tématu.

Ráda bych rovněž poděkovala lékařům MUDr. P. Lotkovi a MUDr. J. Galátovi z gynekologického ústavu G-MED v.o.s. za ochotu spolupracovat a odebírat vyšetřovaný materiál.

SOUHRN

Diplomová práce je zaměřena na výskyt mikroorganismů *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* v genitálním ústrojí žen.

Vyšetřili jsme 96 stěrů z krčku děložního na přítomnost *G. vaginalis*, *M. hominis* a *U. urealyticum*.

G. vaginalis jsme prokázali ve 40 (46,5 %) vzorcích, *U. urealyticum* v 48 (50 %) vzorcích a *M. hominis* v 10 (10,4 %) vzorcích.

Výsledky vyšetření jsme hodnotili ve vztahu k věku pacientek, používané antikoncepci, klinické symptomatologii a gynekologické anamnéze.

Ženy byly rozděleny do osmi věkových kategorií. Nejvyšší frekvence výskytu *G. vaginalis* (83,3 %) jsme zaznamenali u žen mezi 51 - 55 lety, *U. urealyticum* (66,7 %) mezi 19 - 25 lety a *M. hominis* (27,3 %) mezi 46 - 50 lety.

Na základě druhu používané antikoncepce byly ženy rozděleny do 3 skupin. Nejčastěji se *G. vaginalis* vyskytovala u žen s nitroděložním tělískem (66,7 %), *U. urealyticum* u žen bez antikoncepce (53,4 %) a *M. hominis* u žen s nitroděložním tělískem (33,3 %).

Ve vztahu ke klinické symptomatologii jsme zaznamenali nejvyšší výskyt *G. vaginalis* u gravidních žen (50 %), *U. urealyticum* rovněž u gravidních žen (66,7 %) a *M. hominis* u žen s prekancerózami (14,9 %). U žen s prekancerózami jsme zjistili *G. vaginalis* ve 20 (48,8 %), *U. urealyticum* ve 23 (48,9 %) a *M. hominis* v 7 (14,9 %) případech. U žen s ostatními klinickými příznaky jsme zaznamenali nejvyšší procento výskytu *U. urealyticum* (44,1 %).

Ve skupině žen s různými gynekologickými problémy se nejčastěji vyskytovala *G. vaginalis* u žen s léčenou sterilitou (100 %) a *U. urealyticum* u žen, u nichž došlo k samovolnému potratu (54,5 %).

Z 96 stěrů z krčku děložního jsme dále vyizolovali *Staphylococcus sp.* (14,6 %), *Streptococcus sp.* (6,3 %), *Candida sp.* (10,4 %) a *E. coli* (9,4 %).

Klíčová slova: *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, vaginální mikroflóra, bakteriální vaginóza

SUMMARY

The thesis deals with the occurrence of *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* microorganisms in genital tract of females.

A total of 96 cervical smears were examined for the presence of *G. vaginalis*, *M. hominis* and *U. urealyticum*. *G. vaginalis* was detected in 40 (46,5 %) specimens, *U. urealyticum* in 48 (50 %) specimens and *M. hominis* in 10 (10,4 %) specimens.

The study results were evaluated in relation to the patients' age, used contraception, clinical symptomatology and gynecological history.

Women were divided into 8 age groups. The highest occurrence of *G. vaginalis* (83,3 %) was detected in women aged between 51 and 55, *U. urealyticum* (66,7 %) showed the highest occurrence in the age group between 19 and 25 years and *M. hominis* (27,3 %) was most frequently detected by women aged between 46 and 50.

Women were divided into 3 groups based on the type of used contraception method. *G. vaginalis* was most frequently detected in women with the intrauterine device (66,7 %), *U. urealyticum* in women with no contraception (53,4 %) and *M. hominis* in women using the intrauterine device (33,3 %).

From the clinical symptomatology point of view, the highest occurrence of *G. vaginalis* was detected in pregnant women (50 %), *U. urealyticum* also in pregnant women (66,7 %) and *M. hominis* was most frequently detected in women with the symptoms of precancerosis (14,9 %). Women with precancerosis were diagnosed with *G. vaginalis* in 20 cases (48,8 %), with *U. urealyticum* in 23 cases (48,9 %) and with *M. hominis* in 7 cases (14,9 %). The highest occurrence of *U. urealyticum* (44,1 %) was observed in women with other clinical symptoms.

In the group of women with various gynecological problems *G. vaginalis* was most frequently detected in women treated for sterility (100 %) and *U. urealyticum* in women who had experienced spontaneous abortion (54,5 %).

The following microorganisms were also isolated from 96 cervical smears: *Staphylococcus sp.* (14,6 %), *Streptococcus sp.* (6,3 %), *Candida sp.* (10,4 %) and *E. coli* (9,4 %).

Keywords: *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, vaginal microflora, bacterial vaginosis

SEZNAM ZKRATEK

AMP	ampicilin
ASCUS	atypické dlaždicobuněčné a žlázové léze cervixu (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance)
BV	bakteriální vaginóza (Bacterial Vaginosis)
CIN	cervikální intraepitelové neoplazie (Cervical Intraepithelial Neoplasia)
CNA	agar obsahující kolistin a kyselinu nalidixovou (Colistin Naladixic Acid Agar)
CO₂	oxid uhličitý
ČA	čokoládový agar
č.š.	číslo šarže
EA	Endův agar
GBS	streptokoky se skupinovým antigenem B (Group B Streptococci)
G+	grampozitivní
G-	gramnegativní
GV	<i>Gardnerella vaginalis</i>
HB	dvouvrstevný agar obsahující krev (Human Blood Bilayer)
HBT	dvouvrstevný agar obsahující krev a Tween (Human Blood Bilayer Tween)
HCl	kyselina chlorovodíková
H₂O₂	peroxid vodíku
HPV	lidský papilomavirus (Human Papilloma Virus)
H-SIL	vysoký stupeň dlaždicové intraepitelové léze (High Grade Squamous Intraepithelial Lesion)
Ig A	imunoglobulin třídy A
KA	krvní agar
KOH	hydroxid draselný
LEEP	excize (vyříznutí) vysokofrekvenční kličkou (Loop Electrical Excision Procedure)
L-SIL	nízký stupeň dlaždicové intraepitelové léze (Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion)
MH	<i>Mycoplasma hominis</i>

MOP	mikrobní obraz poševní
NaCl	chlorid sodný
NaOH	hydroxid sodný
PID	zánětlivé onemocnění pánve (Pelvic Inflammatory Disease)
PNC	penicilin
PPLO	pleuropneumonii podobné organismy (Pleuro-Pneumonia-Like-Organisms)
sp.	species (druh)
TSST	toxin syndromu toxického šoku (Toxic Shock Syndrome Toxin)
UU	<i>Ureaplasma urealyticum</i>

OBSAH

1. ÚVOD.....	10
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1 Mikroflóra genitálního traktu žen.....	11
2.2 Poševní ekosystém.....	12
2.2.1 Fyziologie poševního ekosystému.....	12
2.2.2 Rod <i>Lactobacillus</i>	13
2.3 Mikroorganismy podílející se na onemocnění poševní sliznice.....	14
2.3.1 <i>Gardnerella vaginalis</i>	14
2.3.2 <i>Mycoplasma hominis</i>	15
2.3.3 <i>Ureaplasma urealyticum</i>	16
2.3.4 Rod <i>Candida</i>	17
2.3.5 Rod <i>Staphylococcus</i>	19
2.3.6 Rod <i>Streptococcus</i>	20
2.3.7 Čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>	21
2.4 Bakteriální vaginóza.....	22
2.5 Mikrobiální obraz poševní (MOP).....	24
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	26
3.1 Materiál a metody.....	26
3.1.1 Vyšetřovaný materiál.....	26
3.1.2 Kultivační média.....	26
3.1.3 Diagnostické sety a testy.....	29
3.1.4 Biochemické testy.....	30
3.1.5 Chemikálie a roztoky.....	30
3.1.6 Přístroje a pomůcky.....	31
3.2 Pracovní postup.....	31
3.2.1 Odběr vzorků.....	31
3.2.2 Zpracování vzorků pro identifikaci <i>G. vaginalis</i> a dalších bakterií asociovaných s BV.....	32
3.2.3 Zpracování vzorků pro identifikaci bakterií <i>M. hominis</i> a <i>U. urealyticum</i>	32
3.2.4 Identifikace kmenů.....	35

3.2.5 Stanovení mikrobiálního obrazu poševního.....	35
4. VÝSLEDKY.....	37
4.1 Růst <i>G. vaginalis</i> , <i>M. hominis</i> a <i>U. urealyticum</i> na agarových půdách.....	37
4.2 Morfologie bakteriálních buněk po obarvení dle Grama.....	37
4.3 Růst mykoplazmat a ureaplazmat v tekutých půdách.....	38
4.4 Vyhodnocení testů MYCOPLASMA DUO.....	38
4.5 Výsledky vyšetření.....	38
5. DISKUSE A ZÁVĚR.....	45
6. PŘÍLOHA.....	50
7. SEZNAM LITERATURY.....	53

1. ÚVOD

Vulvovaginální infekce jsou jedny z nejčastějších onemocnění genitálního traktu žen. Jedná se o onemocnění infekčního charakteru a lze je rozdělit na bakteriální, virové, plísňové či parazitární.

Genitální trakt žen je osídlen fyziologickou mikroflórou, která nepředstavuje pouze laktobacily, ale také některé aerobní, anaerobní či fakultativně anaerobní bakterie. Laktobacily, které tvoří hlavní součást poševní mikroflóry zkvašují především glykogen, ale i další látky ve vagíně žen na kyselinu mléčnou. Ta se podílí na udržení fyziologicky nízkého pH (3,8 – 4,2) ve vagíně a chrání tak poševní sliznici před kolonizací jinými patogenními mikroorganismy. Absence laktobacilů tedy představuje patologický stav, který je obvykle doprovázen zánětlivým onemocněním. Ve vagíně pak mohou být ve zvýšené koncentraci přítomny bakterie jako je např. *Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*), *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*), *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*) a jiné.

Cílem této diplomové práce byla detekce mikroorganismů, které se podílejí na vzniku bakteriální vaginózy, ze vzorků odebraných z krčku děložního náhodně vybraných žen. Zaměřili jsme se především na průkaz *G. vaginalis*, *M. hominis* a *U. urealyticum*. Výsledky jsme vyhodnotili ve vztahu ke klinické symptomatologii, gynekologické anamnéze, věku pacientky a druhu používané antikoncepce.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mikroflóra genitálního traktu žen

Složení poševní mikroflóry je u každé ženy individuální. Mezi faktory, které mohou zásadně ovlivňovat poševní mikroflóru patří věk pacientky, antikoncepce či terapie léky. Mikrobiální flóra je dále výrazně ovlivňována estrogenní stimulací.

Za základní součást poševní mikroflóry jsou považovány především laktobacily. Jsou to delší, tenké, grampozitivní tyčinky, které jsou nepohyblivé, nemají schopnost tvořit spory, neprodukují katalázu a mají výraznou schopnost zkvašovat cukry zejména laktózu. Laktobacily, které tvoří hlavní součást poševní mikroflóry u žen, dříve nazývané Doderleinovy laktobacily, zkvašují především glykogen, ale i další látky ve vagíně žen na kyselinu mléčnou. Ta se podílí na udržení fyziologicky nízkého pH ve vagíně a chrání tak poševní sliznici před kolonizací jinými patogenními mikroorganismy. Kromě kyseliny mléčné mohou tvořit i peroxid vodíku, který inhibuje rozvoj nežádoucí mikroflóry (Klaban, 2005; Bednář a kol., 1996).

Součástí poševní mikroflóry však nejsou pouze laktobacily, ale i jiné druhy bakterií. Mezi aerobní bakterie, které mohou být vyizolovány z vagíny zdravé ženy patří např. α, β hemolytické streptokoky, nehemolytické streptokoky, *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), enterokoky, ale také *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*), *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*) či *Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*). Z anaerobních bakterií to jsou např. *Bacteroides species* (sp.), *Bifidobacterium* sp., *Clostridium* sp., *Peptostreptococcus* sp. a další (Mašata a kol., 2004).

Vaginální mikroflóru může současně tvořit několik druhů bakterií. Při přemnožení některých druhů, však může docházet ke změnám, které vedou ke vzniku vulvovaginálních infekcí.

Hlavní příčinou zánětů vagíny jsou infekce způsobené bakteriemi *Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*), *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*), *Chlamyda trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli* (*E. coli*) či genitální mykoplazmata (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*).

2.2 Poševní ekosystém

2.2.1 Fyziologie poševního ekosystému

Poševní ekosystém představuje přirozenou ochranu genitálního ústrojí ženy před rozvojem a rozšířením zánětlivého onemocnění. Tuto ochranu zajišťují faktory:

- Slizniční imunitní systém, který se podílí na produkci velkého množství sekrečního imunoglobulinu A (IgA) a společně s leukocyty, lymfocyty a makrofágy tvoří cervikovaginální sekret.
- Hormonální hladiny menstruačního cyklu

V prepubertálním období je hladina estrogenů velmi nízká a minimální je i obsah glykogenu v epitelových buňkách, takže pH vagíny je spíše alkalické. V pubertě dochází k nástupu produkce estrogenů a ke zvýšení obsahu glykogenu v cyklicky se odlupujících epitelových buňkách a k osídlení vagíny laktobacily. Po menopauze sliznice atrofuje, laktobacily mizí a pH je spíše neutrální.

- Endogenní poševní mikroflóra

Je tvořena aerobními a anaerobními mikroorganismy, které jsou ve vzájemné rovnováze. Její složení je u každé ženy individuální a závisí na endogenních a exogenních vlivech (hormonální hladiny, sexuální aktivita, antibiotická léčba atd.).

Dozor nad endogenní poševní mikroflórou je přisuzován laktobacilům, jejichž hlavním úkolem je fermentace glukózy na kyselinu mléčnou, produkce peroxidu vodíku a produkce bakteriocinů.

- Kyselé poševní pH

Jeho stabilita je zajišťována kontinuálním štěpením glykogenu na kyselinu mléčnou (její pH je 3,0 - 3,5). Během menstruačního cyklu pH kolísá. Při menstruaci dochází ke snížení obsahu glykogenu a pH je nejvyšší, vytvářejí se tak podmínky pro rozvoj aerobní flóry. Po menstruaci poševní pH klesá a uprostřed cyklu je poševní pH nejnižší a celý ekosystém je optimálně vyvážen (Citterbart a kol., 2001; Čech a kol., 1999; Čihák, 2002).

2.2.2 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je řazen do čeledi *Lactobacillaceae* a zahrnuje více než 130 druhů. Některé druhy laktobacilů jsou hlavní součástí poševní mikroflóry žen ve fertilním věku. Jde například o druh *Lactobacillus acidophilus*.

Laktobacily jsou grampozitivní delší tenké tyčinky, často seskupené do řetízků. Jsou nepohyblivé, nemají schopnost tvořit spory a neprodukují katalázu. Jejich významnou schopností je zkvašovat cukry včetně laktózy. Z hlediska nároků na kyslík se obecně považují za mikroaerofilní nebo fakultativně či striktně anaerobní (Bednář a kol., 1996; Klaban a kol., 2005).

Hlavním úkolem vaginálních laktobacilů je:

- 1) Fermentace glykogenu a dalších látek ve vagíně na kyselinu mléčnou, která zajišťuje fyziologicky nízké pH ve vagíně (3,8 – 4,2) a chrání tak sliznici před osídlením jinými mikroorganismy.
- 2) Produkce peroxidu vodíku, který je pro některé bakterie ve vyšších koncentracích toxický a inhibuje jejich růst.
- 3) Produkce bakteriocinů. Jedná se o sloučeniny bílkovinné povahy, které aktivně působí pouze na povrchu laktobacilů a mají baktericidní účinek (Citterbart a kol., 2001).

Poruchy hladiny estrogenu ovlivňují přítomnost glykogenu v epitelových buňkách poševní sliznice a mohou vést k narušení rovnováhy vaginální mikroflóry a následnému vzniku onemocnění (Julák, 2006).

Některé druhy laktobacilů byly dlouho pokládány za nepatogenní. V současné době se však uvažuje o jejich potenciální patogenitě, jelikož byly izolovány z krve pacientů s endokarditidou, sepsí a ze smíšených anaerobních infekcí (Klaban a kol., 2005).

Ve studii prováděné Aslim a kol. (2006) byly odebírány vzorky z postranní stěny poševní u 19 zdravých žen. U 10 z těchto žen bylo izolováno celkem 58 druhů *Lactobacillus sp.* Song a kol. (1999) ve své studii zjistili, že hlavními zástupci laktobacilů ve vagíně jsou *L. crispatus* a *L. gasseri*.

Tomas a kol. (2003) prokázali, že pouze 6 (4,47 %) z 134 izolovaných kmenů vaginálních laktobacilů jsou schopny inhibovat růst patogenů jako jsou např.

E. coli, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* a *Klebsiella sp.* Collins a Aramaki (1980) zjistili, že *L. acidophilus* má inhibiční účinek na růst *Pseudomonas sp.*

Aroutcheva a kol. (2001) a Annuk a kol. (2003) neprokázali vzájemnou korelaci mezi aktivitou bakteriocinu, kyselinou mléčnou a produkcí peroxidu vodíku. Dále zjistili, že některé druhy laktobacilů sice produkují peroxid vodíku, ale nepodařilo se jim prokázat jeho inhibiční efekt. Naopak Eschenbach a kol. (1989) uvádějí, že některé druhy laktobacilů, které produkují peroxid vodíku, mohou zabránit porušení poševního ekosystému a zamezit tak vzniku BV.

McLean a kol. (2000) vyšetřili 60 vaginálních stěrů. U vyzolovaných laktobacilů zjišťovali schopnost inhibovat růst *G. vaginalis*, *Bacteroides sp.* a *Prevotella bivia*. Prokázali, že všech 60 kmenů laktobacilů inhibovalo růst bakterií asociovaných s BV.

2.3 Mikroorganismy podílející se na onemocnění poševní sliznice

2.3.1 *Gardnerella vaginalis*

Gardnerella vaginalis dříve *Haemophilus vaginalis* (Gardner a Dukes, 1955) nebo též *Corinebacterium vaginale* (Zinnemann a Turner, 1963) původně patřila do rodu *Haemophilus*. V současné době je vyčleněná do samostatného rodu *Gardnerella*, patřící do čeledi *Bifidobacteriaceae*.

Bakteriální buňky *G. vaginalis* jsou gramnegativní či gramlabilní drobné tyčinky. Tyto tyčinky jsou pleomorfní o velikosti přibližně 0,5 x 1,5 až 2,5 μm. Jsou nepohyblivé, nesporulující a netvoří pouzdra. Nemají rovněž schopnost tvořit katalázu ani oxidázu. Podle nároků na kyslík jsou řazeny mezi mikroaerofilní bakterie (Klaban a kol., 2005; Votava a kol., 2003).

G. vaginalis tvoří beta-hemolýzu na médiích obsahující lidskou nebo králičí krev. Na médiích s ovčí krví nehemolyzuje. Z hlediska růstových podmínek je tato bakterie náročná. Nejlépe roste na čokoládovém agaru v prostředí za zvýšené tenze CO₂ či anaerobně (Bednář a kol., 1996). *G. vaginalis* vyžaduje 48 hodinovou inkubaci

při 37 °C v prostředí s 5 % CO₂. Pro záchyt tohoto druhu z klinického materiálu se používá selektivní půda s antibiotiky. Identifikaci lze provést pomocí biochemických testů. Většina kmenů zkvašuje maltózu za tvorby kyseliny, bez plynu a nitráty neredukují (Klaban a kol., 2005). *G. vaginalis* produkuje cytolytický extracelulární toxin, který způsobuje hemolýzu lidských erytrocytů (Rottini et al., 1990).

Významnou schopností *G. vaginalis* je adheze k epiteliálním buňkám vagíny a uretry prostřednictvím tenkých fimbrií. Tato schopnost adheze se zvyšuje s rostoucím pH ve vagíně (Sobel et al., 1981).

G. vaginalis je považována za součást poševní mikroflóry. Bývá izolována z urogenitálního traktu zdravých žen. Často je však dávána do souvislosti s onemocněním bakteriální vaginóza. Gardner a Duke (1955) zjistili *G. vaginalis* u 92 % žen s BV a u 20 % žen s trichomoniázou.

G. vaginalis však není hlavním a jediným kritériem pro vznik BV. Přemnožení této bakterie může být zapříčiněno hormonální dysbalancí a následným porušením poševního ekosystému.

2.3.2 *Mycoplasma hominis*

Mycoplasma hominis je taxonomicky řazeno do rodu *Mycoplasma*, čeledi *Mycoplasmataceae*, řádu *Mycoplasmatales* a třídy *Mollicutes*. Výraz „*Mollicutes*“ vychází z latinského mollis = měkký a cutis = kůže.

První mykoplazma bylo vykultivováno ze skotu jako původce bovinní pleuropneumonie. Další podobné izoláty byly pak označovány PPLO (Pleuro-Pneumonia-Like-Organism).

Rod *Mycoplasma* zahrnuje mikroorganismy, které netvoří peptidoglykan a nemají buněčnou stěnu, tudíž nejsou morfologicky stabilní. Od běžných bakterií se liší výskytem sterolů v cytoplasmatické membráně. Cytoplasmatická membrána je třívrstevná (1-8 nm) a je tvořena bílkoviny, lipidy a cukry. Významnou součástí membrány je cholesterol, který přispívá k její stabilitě.

Mykoplazmata jsou nejmenší bakterie schopné růstu na bezbuněčných médiích. Jejich tvar bývá kokoidní, prstencovitý, tyčinkovitý či vláknitý o velikosti přibližně 0,3 – 0,8 μm. Tvar buněk se liší podle druhů mykoplazmat a růstových podmínek.

Pro kultivaci *M. hominis* se používají komplexní média označována jako PPLO agar a PPLO bujón. Z důvodů zvýšených nutričních požadavků jsou média obohacována o nezbytné suplementy obsahující růstové faktory. Mezi ně patří hlavně koňské sérum, které je zdrojem bílkovin, cholesterolu a nenasycených mastných kyselin. Dále je přidáván kvasnicový extrakt jako zdroj vitamínů a aminokyselin. Médium je dále doplněno o antibiotika (PNC, AMP) a octan thallný. Tyto inhibiční látky potlačují růst nežádoucí doprovodné mikroflóry. Kultivační médium lze dále obohatit o aminokyselinu arginin, kterou *M. hominis* využívá jako zdroj energie. Inkubace probíhá nejlépe v mikroaerofilním prostředí 3 a více dnů při 37 °C.

Kolonie *M. hominis* mají typický vzhled „sázeného vejce“ (fried egg). *M. hominis* nevytváří hemolýzu na krevním agaru, nezkrvňuje laktózu, ale podílí se na štěpení argininu na amoniak (Klaban a kol., 2005).

Někteří zástupci rodu *Mycoplasma* především *M. hominis* patří mezi běžnou mikroflóru, která osidluje sliznice urogenitálního traktu zdravých lidí (Mašata a kol., 2004). Ve zvýšené míře jsou mykoplazmata prokazována u žen s BV (48 - 63 %).

U žen s BV prokázali Schlicht a kol. (2004) *M. hominis* ve 24 - 75 % případů. Oproti tomu u žen bez BV v 13 - 22 % případů. Dále prokázali vzájemný vztah mezi abnormálními urogenitálními nálezy u sexuálně aktivních mladých jedinců a výskytem mykoplazmat a ureaplazmat.

Hunter a Long (1958) izolovali mykoplazmata ze skupiny 39 žen trpících vaginitidou ve 48 % případů. Robinson a McCormack (1980) prokázali společné působení *M. hominis*, *G. vaginalis* a ostatních mikroorganismů na vzniku nespecifické vaginitidy. Asociaci *M. hominis* s BV u gravidních žen prokázali Keane a kol. (2000) v 53 % případů.

2.3.3 *Ureaplasma urealyticum*

Ureaplasma urealyticum je taxonomicky začleněno do rodu *Ureaplasma*, čeledi *Mycoplasmataceae*, řádu *Mycoplasmatales* a třídy *Mollicutes*.

Poprvé byl tento mikroorganismus izolován v roce 1954 z uretritidy. Pro své velmi malé kolonie byl původně označován jako T – mykoplazmata (tiny=drobounký).

Hlavním zástupcem rodu *Ureaplasma* je *Ureaplasma urealyticum*, které se vyskytuje v urogenitálním traktu i u zdravých jedinců. Může být příčinou negonokokových uretritid. U mužů bývá izolováno z prostatitid a u žen se nachází při abortech či kongenitálních nákazách novorozenců (Bednář a kol., 1996).

Jedná se o bakterie menší než mykoplazmata s podobnými morfologickými vlastnostmi. Typickým znakem ureaplazmat je tvorba ureázy.

Pro kultivaci *U. urealyticum* se používají kultivační média jako je PPLO agar a PPLO bujón obohacená o potřebné suplementy viz *M. hominis*. Hlavním substrátem ureaplazmat je urea, která je štěpena ureázou na oxid uhličitý a amoniak. Do kultivačního média je společně s ureou přidávána fenolová červeň jako acidobazický indikátor. Uvolněný amoniak ureáza-pozitivními kmeny alkalizuje kultivační prostředí, a pH se tím posunuje směrem do zásadité oblasti. Vzestup pH je indikován změnou barvy fenolové červeně ze žluté do sytě červené. Inkubace probíhá nejlépe v mikroaerofilním prostředí 2 – 3 dny při 37 °C (Klaban a kol., 2005).

U. urealyticum se na vzniku BV podílí v menší míře než *M. hominis*. (Keane et. al., 2000). Blackwell a kol. (1983) izolovali *U. urealyticum* v 63 % případů u žen s BV. Hillier a kol. (1995) provedli studii, ve které vyšetřili 171 těhotných žen. *U. urealyticum* prokázali u 78 % žen s normální flórou a u 92 % žen s BV.

2.3.4 Rod *Candida*

Mikroorganismy rodu *Candida* jsou původci povrchových i systémových endogenních mykóz. Kvasinky mají schopnost tvořit různé tvary s různě silnou buněčnou stěnou. Kvasinkovité formy se množí pučením. Jsou schopny vytvářet blastokonidie, pseudohyfy a hyfy, kterými prorůstají do tkáně (Bednář a kol., 1996). Předpokládá se, že k hlavním faktorům patogenity patří schopnost rychlého klíčení ve tkáních, tvorba proteáz, přítomnost adhezínů a rychle měnit povrchové struktury (Votava a kol., 2003).

Kandidy jsou druhým nejčastějším vyvolavatelem poševních infekcí, způsobujících tzv. vulvovaginální kandidózu. Při kvasinkové infekci bývá ve vagíně přítomna v 85 - 90 % *Candida albicans* a *Candida tropicalis* (Kobilková a kol, 2005).

Kvasinky lze ve vagíně považovat za podmíněně patogenní mikroorganismy. Trpělivě čekají na optimální příležitost k pučení a přechodem na tzv. hyfální formu si

usnadňují průnik mezi jednotlivé vrstvy poševní sliznice. Kandida vstupuje do vagíny jako blastospora, musí se přichytit, konkurentům odebrat živiny a překonat obranný imunitní systém.

Mezi základní symptomy vaginální kandidózy patří výrazné svědění a výtok, tělesná teplota není zvýšená. V akutní fázi zánětu je poševní sliznice zarudlá a zduřelá s typickým tvarohovitým výtokem, někdy může být postižena i vulva (vulvovaginitis) (Citterbart a kol., 2001). Při hodnocení mikrobiálních obrazů poševních v preparátech obarvených dle Giemsy, vaginální mykóze odpovídá MOP VI. V preparátu nalézáme kromě zastoupení koků a tyčinek hlavně četné, oválné větší i menší útvary – kvasinky. A velmi často jsou přítomna hrubá vlákna – pseudomyceliární růstová forma kvasinek z rodu *Candida*.

Ve studii, kterou prováděli Brown a kol. (2004) bylo testováno celkem 425 pacientek s vaginitidou a vaginosou. *Candida* byla přítomna u 45 (10,6 %) pacientek a *G. vaginalis* u 190 (44,7 %) pacientek. Kandidóza je časté onemocnění především mladých žen, u kterých Adad a kol. (2001) prokázali *Candida sp.* ve 22,5 % případů. Naopak nízký výskyt zaznamenali u pacientek starších 50ti let.

Pirotta a kol. (2006) zjistili výskyt *Candida sp.* u 21 % zdravých žen a u 37 % žen po antibiotické léčbě. *C. albicans* prokázali v 73 % a *C. glabrata* ve 20 % případů. Richter a kol. (2005) izolovali *C. albicans* u žen s vulvovaginitidou v 76 % a *C. glabrata* v 16 % případů.

Monif a kol. (1998) izolovali ze vzorků odebraných z vagíny a cervixu *C. albicans* ve 20 % případů. Tento druh byl prokázán společně se streptokoky a *G. vaginalis* ve 27,3 % případů.

Louvois a kol. (1975) izolovali *C. albicans*, *M. hominis* a *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*) u těhotných žen s vulvovaginitidou.

Belkum a kol. (2001) zjišťovali výskyt bakterií u sexuálně přenosných onemocnění. *T. vaginalis* prokázali v 79 % případů a *M. hominis*, které se vyskytovalo s *C. albicans*, v 11 % případů.

U žen trpících rekurentní BV Devillard a kol. (2005) zjistili přítomnost *C. albicans*, stafylokoků a *G. vaginalis*. U pacientek trpících BV a zánětlivým onemocněním pánve (PID) byl prokázán výskyt *C. albicans* s *G. vaginalis*, *M. hominis*, *U. urealyticum*, *E. coli* a streptokoků (Ness et al., 2005).

2.3.5 Rod *Staphylococcus*

Stafylokoky jsou grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující a většinou neopouzdržené koky. Jsou kataláza pozitivní a oxidáza negativní. Mají respirační i fermentační typ metabolismu. Rostou v médiích obsahujících 10 % NaCl (Bednář a kol., 1996).

Produkují celou řadu enzymů a toxinů. Mezi stafylokokové toxiny patří zejména enterotoxiny, hemolyziny, exfoliativní toxin a toxin syndromu toxického šoku (TSST). Mezi významné enzymy se řadí plazmakoaguláza, hyaluronidáza, lipázy, nukleázy, fibrinolysin a β -laktamáza.

Z hlediska patogenity mají pro člověka význam především koaguláza-pozitivní druh *S. aureus* a koaguláza-negativní druhy *S. epidermidis* a *S. saprophyticus* (Bednář a kol., 1996; Votava a kol., 2003).

Rupp a kol. (1992) provedli studii, ve které testovali celkem 257 pacientek na přítomnost stafylokoků v urogenitálním traktu. U 19 (7,4 %) žen byl urogenitální trakt kolonizován *S. saprophyticus* a u 21 (8,2 %) kmeny novobiocin-rezistentní a koaguláza-negativní *non-S. saprophyticus*. Z děložního krčku byl izolován *S. saprophyticus* v 10 % případů.

Ve studii zaměřené na výskyt *S. aureus* produkujících TSST-1, Parsonnet a kol. (2005) prokázali 75 % netoxigeních kmenů *S. aureus* (TSST-1 negativní) a 25 % kmenů toxigeních (TSST-1 pozitivní). V 38 % případů byl *S. aureus* přítomen ve vzorcích z vagíny.

Lansdell a kol. (1984) se ve své studii zaměřili na rekurentní výskyt *S. aureus* u žen během menstruace. U 97 mladých žen, prokázali 26% výskyt *S. aureus*.

Schlievert a kol. (2007) zjišťovali výskyt *S. aureus* u žen, které během menstruace používali tampóny. Vaginální vzorky z roku 1980 a 1981 byly porovnány se vzorky z roku 2003 až 2005. V roce 1980 a 1981 kolonizoval vagínu *S. aureus* ve 12 % zatímco v roce 2003 až 2005 byl zaznamenán 23% výskyt *S. aureus* produkující TSST-1.

Devillard a kol. (2005), kteří se zabývali studiem opakujících se infekcí BV prokázali mimo jiné i přítomnost *Staphylococcus epidermidis* (3 %) ve vzorcích z krčku děložního.

2.3.6 Rod *Streptococcus*

Streptokoky jsou nesporulující, fakultativně anaerobní, grampozitivní koky uspořádané obvykle v řetízcích nebo ve dvojicích. Na rozdíl od stafylokoků jsou kataláza negativní. Podle typu hemolýzy, kterou vytvářejí na krevním agaru s beranými erytrocyty, jsou členěny na β -hemolytické, viridující a nehemolytické.

U člověka jsou za hlavní patogeny považovány *S. pyogenes*, *S. agalactiae* a *S. pneumoniae*. Skupina tzv. viridujících streptokoků tvoří běžnou součást mikroflóry dutiny ústní a kromě tvorby zubního kazu se v patogenitě uplatňuje jen zřídka. Streptokoky jsou rozděleny podle sérologických vlastností stěnových antigenů, zvaných též polysacharid C, do skupin, které v roce 1933 zavedla Rebecca Craighill Lancefieldová. Streptokoky rozdělila do osmnácti antigenních skupin, označovaných velkými písmeny (v současnosti A až Z) (Julák, 2006; Bednář a kol., 1996).

K faktorům patogenity streptokoků patří zejména M protein, kyselina lipoteichová a F protein. Ty umožňují především adhezi na buněčné povrchy. Z extracelulárních faktorů virulence jsou nejznámější streptolysin O, streptolysin S, streptokinázy, hyaluronidáza, deoxyribonukleáza, proteinázy, pyrogenní toxin a další (Bednář a kol., 1996; Votava a kol., 2003).

Vaginální sliznici může kolonizovat především *S. agalactiae* se skupinovým antigenem B. Nosičství je významné zejména u těhotných žen, neboť v průběhu porodu může dojít k přenosu *S. agalactiae* na novorozence. Následně se u novorozence mohou projevit meningitidy, sepse či pneumonie. Vaginální nosičství bylo prokázáno u 10 % žen. *S. agalactiae* může být příčinou potratů, infekcí těhotných a poporodních infekcí rodiček (Bednář a kol., 1996; Julák, 2006).

Konnick a Edberg (1990) prokazovali streptokoky se skupinovým antigenem B (GBS) u těhotných žen. Z 434 vaginálních stěrů bylo pozitivních 14,7 % stěrů. Wald a kol. (1987) prováděli izolaci GBS z vaginálních stěrů. Streptokoky identifikovali pomocí rychlé metody latexové aglutinace a podle morfologie růstu na krevním agaru. Výskyt streptokoků prokázali u 40,4 % vzorků.

Gupta a Briski (2004) prováděli detekci GBS u vzorků odebraných z rektovaginální oblasti, vagíny a krčku děložního. GBS zjistili u 23,3 % rektovaginálních vzorků, 23,8 % vaginálních vzorků a u 28,9 % vzorků

z děložního krčku. Kolonizace vagíny GBS může být tedy přechodná, chronická nebo občasná a může postihovat 10 - 30 % těhotných žen (Gupta et. al., 2004). Gray a kol. (2007) sledovali výskyt GBS u kojenců. Celkem vyšetřili 57 kojenců, z nichž detekovali GBS v krvi u 72 %, v krvi a mozkomíšní tekutině u 12 % a pouze v mozkomíšní tekutině u 15,7 % kojenců.

Schrag a kol. (2000) zaznamenali 20% výskyt GBS u novorozenců týden po porodu. Fluegge a kol. (2006) vyizolovali GBS z mozkomíšní tekutiny u 96 % novorozenců během prvních třech měsíců jejich života.

2.3.7 Čeleď *Enterobacteriaceae*

Čeleď *Enterobacteriaceae* je velmi rozsáhlá a zahrnuje celkem 44 rodů. Jedná se o fakultativně anaerobní, nesporulující, gramnegativní tyčinky, vyskytující se v lidském střevě i v okolním prostředí. Mají složitou antigenní strukturu, danou složením somatických, bičíkových, kapsulárních a dalších antigenů. Medicínsky významné druhy jsou většinou potenciálně patogenní, jako původci intestinálních onemocnění. Často také působí nebezpečná extraintestinální, zejména močová onemocnění (Julák, 2006).

E. coli je gramnegativní pohyblivá tyčinka štěpící laktózu a glukózu za tvorby plynu (Votava a kol., 2003). Je fyziologicky přítomna ve střevní sliznici, kde napomáhá odbourávat nestrávené složky potravy a inhibovat jiné nežádoucí patogeny. Existují však kmeny *E. coli*, které způsobují nebezpečné gastrointestinální infekce či uroinfekce.

Ve studii prováděné Watt a kol. (2003) byly izolovány kmeny *E. coli* ze vzorků těhotných žen a novorozenců. Ze 105 kmenů bylo vyizolováno 24 (23 %) kmenů ze střevní mikroflóry, 25 (24 %) kmenů z vaginální sliznice u těhotných žen a 27 (25,7 %) kmenů z amniové tekutiny, krve a mozkomíšní tekutiny u novorozenců.

Cook a kol. (2001) vyizolovali *E. coli* (45 %) z genitálního traktu žen s vaginitidou, abscesy vaječníků a vejcovodů a neonatálních sepsí.

Devillard a kol. (2005) a Ness a kol. (2005) izolovali *E. coli* ze vzorků žen s opakující se BV (40 %) a PID (14 %). Xie a kol. (2006) prokázali výskyt *E. coli* ve vagíně, konečníku a močovém měchýři u pacientek trpících infekcí močového traktu.

Celkem izolovali 88 druhů *E. coli* přítomných ve vagíně, konečníku a močovém měchýři a 54 druhů bylo přítomnou pouze v konečníku.

2.4 Bakteriální vaginóza

Bakteriální vaginóza (BV) je nezápovědné onemocnění poševní sliznice, způsobené ztrátou aerobních laktobacilů a převahou anaerobních bakterií. Původně se tento syndrom nazýval „nespecifická vaginitida“, pro odlišení od specifických vaginitid vyvolaných trichomonádami a plísněmi.

Etiologie bakteriální vaginózy je multifaktoriální. Jedním z faktorů je zvýšení pH ve vagíně z fyziologického 3,5 - 4,5 na 7, kdy je inhibován účinek peroxidu vodíku. Důvodem je přemnožení anaerobních poševních bakterií na úkor laktobacilů tvořících peroxid vodíku.

Mezi rizikové faktory pro vznik BV, patří časté gynekologické zákroky, interrupce a užití nitroděložního tělíska (naopak užití hormonální antikoncepce výskyt BV snižuje z důvodu potlačení proměnlivých hormonálních hladin). Onemocnění BV se často vyskytuje spolu se sexuálně přenosnými chorobami a je rovněž považováno za sexuálně přenosné onemocnění (Hay, 2005).

G. vaginalis je považována za spouštěcí faktor vzniku bakteriální vaginózy (BV). Bylo však zjištěno, že se tato bakterie vyskytuje u 40 - 50 % žen bez BV. *Mycoplasma hominis* je přítomno asi u 24 - 75 % žen s BV. Až v 77 % se při BV vyskytuje bakterie *Mobiluncus* a to především druhy *Mobiluncus curtisii* a *Mobiluncus mulieris*. Ve zvýšené koncentraci rovněž mohou být přítomny *Fusobacterium parvula*, *Veillonella parvula* či zástupci anaerobních bakterií (*Bacteroides bivus*, *Peptostreptococci sp.*, *Peptococci sp.*, *Eubacterium sp.*) (Mašata a kol., 2004).

Smayevsky a kol. (2001) se zabývali studiem výskytu mikroorganismů asociovaných s BV. Celkem bylo vyšetřeno 109 žen, přičemž 47 (43 %) z nich mělo příznaky BV a 62 (57 %) bylo bez příznaků. Došli k závěru, že anaerobní bakterie se vyskytovaly v 91 % případů u žen s BV a v 18 % případů u žen bez BV. *Peptostreptococcus sp.*, *Prevotella bivia* a *Porphyromonas sp.* byly hlavně asociovány s BV. *G. vaginalis* a *M. hominis* byly izolovány v 76 % a 42 % případů u žen s BV. Zástupci z rodu *Mobiluncus* se rovněž vyskytovali u žen s BV a to ve 34 % případů.

Ve studii prováděné Aggarwal a kol. (2002) byla zjišťována asociace anaerobů s BV, kde prokázali přítomnost 55,4 % *Peptostreptococcus sp.*, 20 % *Bacteroides sp.*, 24 % *Prevotella sp.*, 24 % *Clostridium sp.*, 12 % *Eubacterium sp.*, 8 % *Fusobacterium sp.* atd. Rosenstein a kol. (1996) izolovali anaerobní streptokoky u 74 % pacientek s BV a u 60 % pacientek zástupce rodu *Bacteroides*. Levison a kol. (1979) izolovali *Peptostreptococcus sp.* v 42 %, *Peptococcus sp.* v 42 % a *Bacteroides sp.* v 50 % případů u pacientek trpících nespecifickou vaginitidou. Krohn a kol. (1989) izolovali *Bacteroides sp.* v 62 % a *Peptostreptococcus sp.* v 59 % případů gravidních žen s BV, které splňovaly tři ze čtyř klinických kritérií, přičemž tři dny po porodu došlo u těchto žen k návratu anaerobů, které mohou být příčinou endometritidy či poporodních sepsí. Catlin a kol. (1992) jež se zabývali studiem *G. vaginalis* zjistili zastoupení této bakterie společně s *Mobiluncus sp.* a *M. hominis* u žen s BV.

V roce 1983 Amsel a kol. zavedli klinická kritéria pro diagnostiku BV. V roce 1991 byla stanovena kritéria dle Nugenta popisující snížení počtu laktobacilů a vzrůst *G. vaginalis*.

Diagnostika BV

Pro diagnostiku BV byla stanovena klinická (Amselova) kritéria. Musí být splněna minimálně 3 z těchto 4 následujících kritérií: (Amsel et. al., 1983)

1. Poševní pH je vyšší než 4,5
2. Přítomnost řídkého výtoku, který adhezuje na poševních stěnách
3. Přítomnost klíčových buněk
4. Pozitivní test s KOH

Klíčové buňky (clue cells) jsou důležitým vodítkem pro diagnostiku BV. Poprvé je popsal Gardner a Dukes v roce 1955. Jedná se o drobné dlaždicové epitelie s neostrými okraji, na nichž adherují četné bakterie, které urychlují cytolýzu, zvyšují množství vaginálního sekretu a současně i jeho pH, což vede k tvorbě optimálního prostředí pro přemnožení anaerobních mikroorganismů, z nichž většina produkuje kyselinu sukcinovou a biogenní aminy. Klíčové buňky lze pozorovat při

mikroskopickém vyšetření nativního preparátu či v preparátu obarveném dle Giemsy. (Sachdeva et al., 2006)

Biogenní aminy lze prokázat pomocí tzv. aminového testu, který je v případě BV pozitivní. Aminový test je založen na uvolnění biogenních aminů (putrescin, kadaverin, trimethylamin) v alkalickém prostředí, takže po přidání 10% KOH k sekretu vagíny je cítit typicky rybí zápach.

Poševní pH se stanovuje pomocí testačního papírku, který se umístí na přední stěnu poševní (Citterbart a kol., 2001).

2.5 Mikrobiální obraz poševní (MOP)

Stanovení mikrobiálního obrazu poševního (MOP) je součástí mikroskopického vyšetření výtěru z vagíny. Poskytuje informaci o mikrobiologickém stavu poševní sliznice a může tak přispět k objasnění příčiny výtoku. Odběr se provádí při kolposkopickém vyšetření jako stěr sterilním vatovým tampónem ze zadní klenby poševní nebo čípku.

Odebraný vzorek se v laboratoři nanese na podložní sklíčko. Po zaschnutí se preparát fixuje methanolem 3 minuty, poté se barví Giemsovým barvivem, při rychlé metodě barvivem zředěným 1:2 po dobu 30 - 60 minut nebo při pomalé metodě barvivem zředěným 1:10 nebo 1:20 po dobu 12 - 24 hodin. Nakonec se obarvený preparát opláchne destilovanou vodou. Preparát pozorujeme za použití imerze při zvětšení 1000x.

Giemsovo barvivo je vhodné pro mikroskopické vyšetření vaginálního sekretu, jelikož dobře diferencuje buněčné struktury. Po obarvení jsou buněčná jádra epiteliálních buněk červeně fialová, cytoplazma světle modrá, cytoplazma erytrocytů světle fialová, erytrocyty jsou růžové nebo červené a bakterie modrofialové.

Mikrobní obrazy poševní (MOP) jsou charakterizovány do 6 základních stupňů podle Jírovce, Petera a Málka.

- MOP I. fyziologický obraz
- MOP II. nehnisavý bakteriální výtok (bakteriální vaginóza)
- MOP III. hnisavý bakteriální výtok (bakteriální vaginitida)
- MOP IV. kapavčitý výtok (kapavka)
- MOP V. trichomonádový výtok (trichomoniáza)
- MOP VI. kvasinkový výtok (hnisavá nebo nehnisavá vaginální mykóza)

Z výše uvedené charakteristiky MOPů vyplývá, že bakteriální vaginóza resp. *G. vaginalis* je spojována s MOP II. Tento MOP je charakterizován absencí přirozeně přítomných laktobacilů a převahou jiných skupin bakterií, které se nacházejí na povrchu epitelálních buněk. Zánětlivá reakce je malá, proto v preparátu nacházíme pouze malé množství leukocytů.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Vyšetřovaný materiál

Vyšetřovaným materiálem byly stěry z krčku děložního žen. Klinický materiál jsme dopravili do laboratoře v transportním médiu a ihned zpracovali. Ke každému vyšetřovanému materiálu jsme obdrželi průvodní list, který obsahoval informace o věku pacientky, gynekologické anamnéze a klinickém nálezu.

3.1.2 Kultivační média

Pro kultivaci vzorků, izolaci kmenů a provedení některých testů jsme používali média:

Gardnerella vaginalis agar – GV agar

4,3 g krevního agaru (KA) č. 3 (firma IMUNA, č.š. 470705) jsme rozpustili ve 100 ml destilované vody a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C. Po ochlazení na teplotu 50 - 60 °C jsme přidali:

10 ml suplementu A (firma Dulab, č.š. 220905)

10 ml suplementu G (firma Dulab, č.š. 060905)

0,01 ml Tweenu 80 (firma HiMedia, č.š. 3-1101)

100 ml plné lidské krve (dodávané Krajskou Nemocnicí Pardubice)

Krevní agar – KA

4 g základu pro krevní agar č. 2 (firma HiMedia, č.š. 0000017141) jsme rozpustili ve 100 ml destilované vody a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C. Po ochlazení na teplotu 50 - 60 °C jsme přidali 7 % defibrinované beraní krve.

Čokoládový agar – ČA

4 g základu pro krevní agar č. 2 (firma HiMedia, č.š. 0000017141) jsme rozpustili ve 100 ml destilované vody a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C. Po ochlazení na teplotu 80 °C jsme přidali 7 % defibrinované beraní krve.

Endův agar – EA

4,7 g základu pro Endův agar (firma Oxoid, č.š. 201052) jsme rozpustili ve 100 ml destilované vody a přidali 0,4 ml bazického fuchsinu. Médium jsme sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

Takto připravené půdy jsme rozlévali do připravených Petriho misek do výšky 4 mm a skladovali při 4 - 5 °C po dobu nejdéle 3 týdnů.

Tekutá půda (TP) s argininem pro kultivaci mykoplazmat

2,1 g Bacto PPLO Broth (firma DIFCO™, č.š. 5221158) jsme rozpustili v 70 ml redestilované vody a sterilizovali 15 – 20 minut v autoklávu při 121 °C. Po ochlazení na teplotu 50 - 60 °C jsme přidali další složky:

10 ml kvasnicového extraktu

20 ml neaktivovaného koňského séra

0,8 ml octanu thallného (10 % roztok)

0,5 ml ampicilinu (100 mg)

0,5 g argininu (L-arginin pro biochemii firmy MERCK, č.š. K19596242)

0,2 ml fenolové červeně (1 % roztok)

pH média jsme upravili 10% roztokem HCl na 6,9 – 7,0.

Bujón jsme skladovali v lednici při 4 - 5 °C po dobu nejdéle 3 týdnů.

Pevná půda (PP) pro kultivaci mykoplazmat

3,5 g Bacto PPLO agar (firma DIFCO™, č.š. 2126603) jsme rozpustili v 70 ml redestilované vody a sterilizovali 15 – 20 minut v autoklávu při 121 °C. Po ochlazení na teplotu 50 - 60 °C jsme přidali další složky:

10 ml kvasnicového extraktu

20 ml neaktivovaného koňského séra

0,8 ml octanu thallného (10 % roztok)

0,5 ml ampicilinu (100 mg)

pH média jsme v případě potřeby upravili 10% roztokem NaOH na 7,2 – 7,3.

Takto připravenou půdu jsme rozlévali do připravených polystyrénových Petriho misek (ø 60 mm) do výšky 4 mm a skladovali v lednici při 4 - 5 °C po dobu nejdéle 3 týdnů.

Tekutá půda (TP) s ureou pro kultivaci ureaplazmat

2,1 g Bacto PPLO Broth (firma DIFCO™, č.š. 5221158) jsme rozpustili v 70 ml redestilované vody a sterilizovali 15 – 20 minut v autoklávu při 121 °C. Po ochlazení na teplotu 50 - 60 °C jsme přidali další složky:

10 ml kvasnicového extraktu

20 ml neaktivovaného koňského séra

0,5 ml ampicilinu (100 mg)

0,2 ml urey (40% roztok) (firma HiMedia, č.š. F-X525)

0,8 ml linkomycinu (o koncentraci 256 mg/l)

0,2 ml fenolové červeně (1 % roztok)

pH média jsme upravili 10% roztokem HCl na 6,0 – 6,3.

Bujón jsme skladovali v lednici při 4 - 5 °C po dobu nejdéle 3 týdnů.

Pevná půda (PP) pro kultivaci ureaplazmat

3,5 g Bacto PPLO agar (firma DIFCO™, č.š. 2126603) jsme rozpustili v 70 ml redestilované vody, smíchali s 0,015 g MnSO₄ a sterilizovali 15 – 20 minut v autoklávu při 121 °C. Po ochlazení na teplotu 50 - 60 °C jsme přidali další složky:

10 ml kvasnicového extraktu

20 ml neaktivovaného koňského séra

0,5 ml ampicilinu (100 mg)

0,2 ml urey (40% roztok) (firma HiMedia, č.š. F-X525)

0,8 ml linkomycinu (o koncentraci 256 mg/l)

0,2 ml fenolové červeně (1 % roztok)

pH média jsme v případě potřeby upravili 10% roztokem HCl na 6,0.

Takto připravenou půdu jsme rozlévali do připravených polystyrénových Petriho misek (ø 60 mm) do výšky 4 mm a skladovali v lednici při 4 - 5 °C po dobu nejdéle 3 týdnů.

Kvasnicový extrakt

1000 g čerstvých pekařských kvasnic jsme homogenizovali v 500 ml teplé redestilované vody a poté doplnili dalšími 500 ml redestilované vody. Suspenzi jsme zahřívali při 80 °C (dodržet, jinak by došlo ke zničení V-faktoru) po dobu 45 minut. Po zchlazení jsme směs centrifugovali 30 minut při 3000 – 4000 otáčkách za minutu.

Sediment jsme odstranili a pH supernatantu jsme upravili na hodnotu 7. Takto připravený supernatant jsme 3x sterilizovali po dobu 1 hodiny při teplotě 80 °C. Sterilní supernatant jsme rozplnili do lahvíček po 50 ml a skladovali při -20 °C.

Koňské sérum

Koňské sérum dodávala firma LabMediaServis s.r.o., Výroba krevních derivátů a kultivačních médií. Neinaktivované koňské sérum jsme uchovávali ve sterilních lahvíčkách o objemu 80 ml při -20 °C nejdéle jeden rok.

10% roztok octanu thallného

V 50 ml odměrné baňce jsme rozpustili 5 g octanu thallného (firma SIGMA, č.š. K0090) v 50 ml sterilní redestilované vody. Roztok jsme skladovali při laboratorní teplotě.

Roztok ampicilinu

Do lahvičky ampicilinu (firma BIOTIKA, č.š. 0605005) o obsahu 500 mg účinné látky jsme přidali 2,5 ml sterilní redestilované vody. Po důkladném rozpuštění jsme roztok skladovali při -20 °C.

1% roztok fenolové červeně

1 g fenolové červeně (firmy LACHEMA) jsme rozpustili ve 25 ml 0,1 M NaOH, v odměrné baňce doplnili na 100 ml sterilní redestilovanou vodou a mírně zahřívali do úplného rozpuštění. Roztok jsme rozplnili do lahvíček po 50 ml a autoklávovali po dobu 10 minut při 115 °C. Dále jsme roztok skladovali při laboratorní teplotě.

3.1.3 Diagnostické sety a testy

Pro zjištění fenotypových, biochemických a antigenních vlastností izolovaných kmenů jsme používali komerčně dodávané mikrotesty a sety:

STAPHYtest 24 (firma LACHEMA, a.s., Brno), č.š. 306607
STREPTOtest 16 (firma LACHEMA, a.s., Brno), č.š. 304607
ENTEROtest 24 (firma LACHEMA, a.s., Brno), č.š. 308507
NEFERMtest 24 (firma LACHEMA, a.s., Brno), č.š. 307607
ITEST PYR test (firma ITEST plus, s.r.o., Hradec Králové), č.š. 1095 – pro stanovení pyrrolidonylpeptidázové aktivity
ITEST STAPHY-KOAGULÁZA (firma ITEST plus, s.r.o., Hradec Králové), č.š. 1084 – k průkazu volné a vázané plazmakoagulázy
ITEST STREPTO GROUP (firma ITEST plus, s.r.o., Hradec Králové), č.š. 1026 – k průkazu skupinových antigenů streptokoků

3.1.4 Biochemické testy

Kataláza

K průkazu katalázy jsme používali 3% roztok peroxidu vodíku v destilované vodě.

Oxidáza

Produkcí oxidázy jsme testovali na prouzcích filtračního papíru napuštěných 1% vodným roztokem tetramethyl-p-fenylendiamin-dihydrochloridu.

3.1.5 Chemikálie a roztoky

Pro přípravu bakteriálních suspenzí a mikroskopických preparátů jsme používali sterilní fyziologický roztok (0,85% roztok NaCl).

K barvení preparátů dle Grama jsme používali 40% alkoholový roztok krystalové violeti v 10% roztoku šťavelanu amonného, 10% vodný roztok jodu v jodidu draselném (Lugolův roztok), 70% ethanol a 10% vodný roztok karbolfuchsinu.

Pro barvení preparátů dle Giemsy jsme používali Giemsovo barvivo ředěné destilovanou vodou v poměru 1:2 a methanol.

3.1.6 Přístroje a pomůcky

Přístroje:

Autokláv (BMT, Sterilab), horkovzdušný sterilizátor (BMT, Sterimat), sušárna (Memmert, UNB500), laminární box MSC 12 (Jouan, MSC12), mrazicí box (Sanyo, MDF-U3086S), lednice (AEG, S70402KG), termostat s 5 % CO₂ (SalvisLab, BC170), vodní lázeň (Memmert, WB14), digitální váhy (Kern, ABT), pH metr (Hanna, pH210), světelný mikroskop (Nikon, YS100), plynový kahan, aparatury na výrobu redestilované a destilované vody (Millipore, RO-plus, Q-plus), centrifuga (HETTICH, typ MIKRO 20).

Pomůcky:

Sterilní vatové tampóny (firma MicroRheologics, č.š. 9SH100), sterilní transportní tampóny (firma COPAN INNOVATION, č.š. 2J8C02), testy MYCOPLASMA DUO (firma Bio-Rad, č.š. 7J2994), mikropipety, špičky, odměrné válce, kádinky, odměrné baňky, Erlenmayerovy baňky, zkumavky, ependorfky, pryžové a silikonové zátky na zkumavky, stojánky na zkumavky, pinzety, bakteriologické klíčky, buničitá vata, mikrotenové sáčky, skleněné a polystyrénové Petriho misky (ø 60mm) (firma MERCI, č.š. 051350), podložní sklíčka, stříčky.

3.2 Pracovní postup

3.2.1 Odběr vzorků

Vzorky odebírali MUDr. P. Lotko a MUDr. J. Galát ze soukromého gynekologického ústavu G-MED v.o.s. v Pardubicích. Vzorky odebírali pomocí dvou typů sterilních tampónů, které bezprostředně po odběru umístili do transportního média pro mykoplazmata a ureaplazmata a do tuhého transportního média. Ke každému vzorku vyplnili průvodní list, který obsahoval datum odběru, číslo vzorku, rok narození pacientky, druh používané antikoncepce a klinický nálezný v době odběru. Vzorky jsme dopravili do laboratoře a ihned zpracovali.

3.2.2 Zpracování vzorků pro identifikaci *G. vaginalis* a dalších bakterií asociovaných s BV

Nejdříve jsme pomocí tampónu z tuhého transportního média provedli nátěr na sterilní podložní sklíčko, který jsme po zaschnutí obarvili dle Giemsy pro identifikaci mikrobiálního obrazu poševního (MOP). Poté jsme vzorky naočkovali na živné půdy v pořadí KA, ČA, GV a nakonec EA. Inkubace KA a EA probíhala 48 hodin při 37 °C, ČA a GV 48 hodin při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂.

Charakter růstu na agarových půdách jsme hodnotili a identifikovali po 24 a 48 hodinové inkubaci. Všímalí jsme si tvaru a povrchu kolonií, okrajů, konzistence, barvy kolonií, vůně či zápachu, popřípadě vzniklé hemolýzy.

Přítomné mikroorganismy jsme testovali na schopnost tvorby katalázy a oxidázy. Dále jsme zhotovili mikroskopický preparát, obarvili jej dle Grama a pozorovali pod imerzí. Vybrané kolonie jsme izolovali a z 24 hodinové čisté kultury jsme provedli dourčení pomocí biochemických testů.

G. vaginalis jsme identifikovali podle charakteru růstu na GV agaru, kde vyrůstala v drobných šedobílých koloniích obklopených zónou hemolýzy. Rovněž jsme zhotovili mikroskopický preparát obarvený dle Grama, ve kterém jsme *G. vaginalis* pozorovali jako gramnegativní až gramlabilní drobnou tyčinku. Test na katalázu a oxidázu byl negativní.

3.2.3 Zpracování vzorků pro identifikaci bakterií *M. hominis* a *U. urealyticum*

Zpracování vzorků kultivační metodou:

Tampónem umístěným v transportním médiu pro mykoplazmata a ureaplazmata jsme provedli roztěr na celý povrch agarového média. Misky s naočkovanými půdami jsme inkubovali v inkubátoru v prostředí s 5 % CO₂ při 37 °C po dobu 2 dnů.

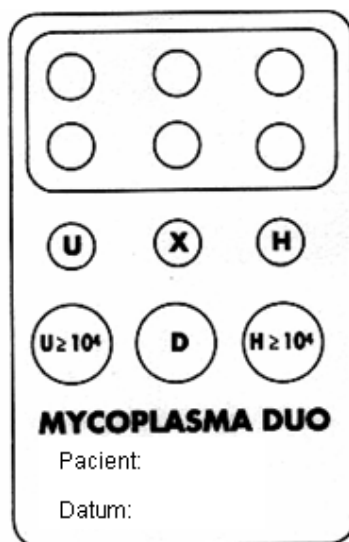
Do připravených pomnožovacích médií PPLO-bujón pro mykoplazmata a ureaplazmata (2 ml) jsme napipetovali 200 µl transportního média.

Dále jsme napipetovali 1ml transportního média do ependorfeček. Vzorky v ependorfkách jsme centrifugovali při 3000 otáčkách po dobu 10 minut. Po centrifugaci jsme odpipetovali 200 μ l sedimentu opět do pomnožovacích médií PPLO-bujón pro mykoplazmata a ureaplazmata (2 ml). Celkem jsme tedy naočkovali dvě zkumavky na průkaz mykoplazmat a dvě zkumavky na průkaz ureaplazmat od každého vzorku, které jsme inkubovali v inkubátoru v prostředí s 5 % CO₂ při 37 °C po dobu 2 dnů. Při změně zbarvení média z původně žluté na červenou jsme vzorek zamrazili (pro pozdější testování jinou metodou) a současně vyočkovali na PPLO agar pro mykoplazmata a ureaplazmata.

Po skončení inkubační doby jsme prováděli hodnocení nárůstu kolonií pomocí mikroskopu při zvětšení 120x.

Zpracování vzorků komerčními sety MYCOPLASMA DUO:

Testy MYCOPLASMA DUO (firma Bio-Rad, č.š. 7J2994) slouží k identifikaci urogenitálních mykoplazmat, založených na specifických metabolických vlastnostech jako je hydrolýza urey – *U. urealyticum* (UU) a hydrolýza argininu – *M. hominis* (MH), přičemž dochází k uvolnění amoniaku a alkalizaci média, což je indikováno změnou barvy média ze žluté na červenou.

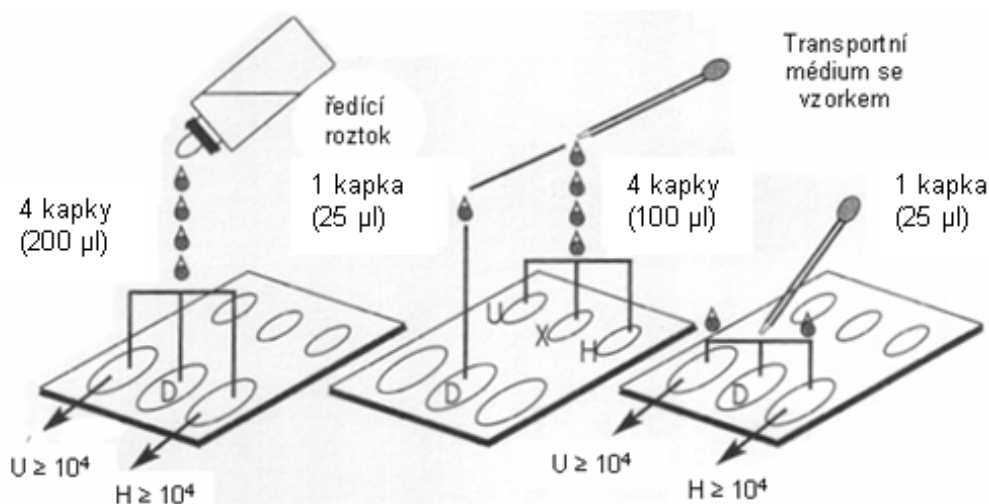


OBRÁZEK 1 Schéma mikrotitrační destičky pro MH a UU

Postup zpracování duotestů byl následující:

4 kapky (200 μl) ředícího roztoku jsme nakapali do každé z jamek mikrotitrační destičky ve spodní řadě (U $\geq 10^4$, D, H $\geq 10^4$). Do každé z jamek v horní řadě (U, X, H) jsme nanесли 4 kapky vzorku z transportního média a do prostřední jamky v dolní řadě (D) destičky jsme aplikovali jednu kapku vzorku z transportního média. Suspenzi v jamce D jsme důkladně homogenizovali a po jedné kapce přenesli do jamek U $\geq 10^4$ a H $\geq 10^4$. Mikrotitrační destičku jsme přikryli průhlednou fólií a inkubovali v inkubátoru v prostředí s 5 % CO_2 při 37 °C po dobu 24 - 48 hodin.

Postup zpracování duotestů je znázorněn na obrázku 2.



OBRÁZEK 2 Postup zpracování duotestů

Po 24 případně 48 hodinové inkubaci jsme odečítali výsledek. V případě pozitivního vzorku na ureaplazmata došlo ke změně zbarvení z původně žluté suspenze na červenou v jamkách U $\geq 10^4$ a U $\leq 10^3$. Pokud vzorek obsahoval mykoplazmata pozorovali jsme změnu zbarvení v jamkách H $\geq 10^4$ a H $\leq 10^3$.

3.2.4 Identifikace kmenů

- **Barvení dle Grama**

Pro morfologickou identifikaci bakteriálních buněk jsme použili barvení podle Grama, což nám umožnilo rozdělit mikroorganismy na grampozitivní (G+) a gramnegativní (G-). Barvení jsme prováděli podle následujícího postupu.

Suspenzi z kultury mikrobů jsme rozetřeli na čisté podložní sklíčko, nechali zaschnout a fixovali plamenem. Preparát fixovaný plamenem jsme převrstvili krystalovou violetí (30 sekund) a následně mořili Lugolovým roztokem (15 – 30 sekund). Preparát jsme opláchli organickým rozpouštědlem (alkoholem nebo acetonem) a vodou a dobarvili karbolfuchsinem (1 minutu) ředěným 1:10.

- **Biochemické vlastnosti**

U kmenů, které jsme na základě morfologie kolonií a bakteriálních buněk identifikovali, jsme testovali katalázu a oxidázu.

Průkaz enzymu katalázy jsme prokazovali sklíčkovým testem. Na podložní sklíčko jsme kápili kapku 3% peroxidu vodíku a do kapky jsme nanесли bakteriologickou kličkou kolonii setřenou z kultivačního média. V pozitivním případě se projeví přítomnost katalázy unikáním plynu – molekulárního kyslíku.

Při průkazu oxidázové aktivity, jsme skleněnou tyčinkou setřeli vyšetřovanou kulturu a nanесли ji na filtrační papír napuštěný 1% vodným roztokem tetramethyl-p-fenylendiamin-dihydrochloridem. Je-li přítomna oxidáza, je činidlo oxidováno příslušným enzymem na fialově modrou substanci – Wursterovu modř.

3.2.5 Stanovení mikrobiálního obrazu poševního

Materiál odebraný tampónem jsme nanесли na sterilní podložní sklíčko a nechali zaschnout. Preparát jsme fixovali 3 minuty v methanolu a následně barvili v kyvetě ve svislé poloze 60 minut Giemsovým barvivem (firma HiMedia, č.š. L-X664) ředěným destilovanou vodou v poměru 1:2. Obarvený preparát jsme opláchli destilovanou vodou, opatrně osušili filtračním papírem a pozorovali v mikroskopu při 1000x zvětšení za použití imerze.

Buněčná jádra epitelálních buněk jsou po obarvení červeně fialová, cytoplazma světle modrá, cytoplazma leukocytů se barví jemně fialově, erythrocyty jsou růžové nebo červené a bakterie modrofialové.

Podle přítomnosti jednotlivých složek jsme zařadili MOP do jedné z šesti uvedených skupin.

- MOP I. fyziologický obraz
- MOP II. nehnisavý bakteriální výtok (bakteriální vaginóza)
- MOP III. hnisavý bakteriální výtok (bakteriální vaginitida)
- MOP IV. kapavčitý výtok (kapavka)
- MOP V. trichomonádový výtok (trichomoniáza)
- MOP VI. kvasinkový výtok (hnisavá nebo nehnisavá vaginální mykóza)

4. VÝSLEDKY

4.1 Růst *G. vaginalis*, *M. hominis* a *U. urealyticum* na agarových půdách

Pro detekci *G. vaginalis* jsme používali selektivní půdu GV agar. Gardnerela vyrůstala na této půdě po 48 hodinové inkubaci při 37 °C v prostředí 5 % CO₂ v drobných šedobílých koloniích obklopených úzkou zónou hemolýzy (viz obr. č. 2 v příloze).

Hodnocení růstu mykoplazmat a ureaplazmat na pevných půdách jsme prováděli mikroskopicky při zvětšení 120x. Po 2 – 3 denní inkubaci vyrůstaly na pevných půdách kolonie s charakteristickým vzhledem „sázeného vejce“ a to především v případě mykoplazmat. Kolonie měly tmavý střed s jemnou periferní zónou (viz obr. č. 3 v příloze). V případě ureaplazmat jsme pozorovali menší tmavé kolonie.

Pro zjištění ostatních mikroorganismů, které se vyskytovaly ve stěrech z krčku děložního, jsme používali KA, ČA a EA. Izolované mikroorganismy jsme dále identifikovali postupy běžně užívanými v mikrobiologické laboratoři.

4.2 Morfologie bakteriálních buněk po obarvení dle Grama

V preparátech obarvených dle Grama jsme v případě *G. vaginalis* pozorovali gramnegativní až gramlabilní drobné tyčinky (viz obr. č. 1 v příloze).

Stafylokoky jsme pozorovali jako grampozitivní koky, které se vyskytovaly jednotlivě, ve dvojicích nebo nepravidelných shlucích.

V případě streptokoků jsme pozorovali grampozitivní koky uspořádané do řetízků.

Kvasinky jsme v mikroskopu pozorovali jako větší fialově se barvící buňky a *E. coli* jako gramnegativní drobné tyčinky.

4.3 Růst mykoplazmat a ureaplazmat v tekutých půdách

Po 2 – 3 denní inkubaci jsme vizuálně sledovali růst mykoplazmat a ureaplazmat v PPLO bujónu. V případě pomnožení *U. urealyticum* či *M. hominis* došlo ke změně zbarvení média, kdy uvolněný amoniak alkalizoval kultivační prostředí, a pH se posunulo směrem nahoru na zásaditou stranu. Vzestup pH jsme tedy indikovali změnou barvy indikátoru fenolové červeně ze žluté do sytě červené (viz obr. č. 4 v příloze).

4.4 Vyhodnocení testů MYCOPLASMA DUO

Po 2 - 3 denní inkubaci jsme vizuálně odečítali výsledek v mikrotitrační destičce. V případě přítomnosti ureaplazmat došlo ke změně zbarvení z původně žluté suspenze na červenou v jamkách $U \geq 10^4$ a U. Pokud vzorek obsahoval mykoplazmata, pozorovali jsme změnu zbarvení v jamkách $H \geq 10^4$ a H. Výsledky testů MYCOPLASMA DUO se shodovaly s výsledky kultivační metody v tekutých půdách.

4.5 Výsledky vyšetření

Celkem jsme vyšetřili 96 tampónových stěrů z krčů děložního a z uvedeného počtu bylo 48 (50 %) vzorků s pozitivním kultivačním nálezem na *U. urealyticum* a 10 (10,4 %) na *M. hominis*. Z počtu 86 tampónových stěrů bylo 40 (46,5 %) vzorků pozitivních na *G. vaginalis*.

Výsledky jsme hodnotili ve vztahu ke gynekologické anamnéze, klinické symptomatologii, věku pacientek a druhu používané antikoncepce.

Výskyt *G. vaginalis* ve stěrech z krčku děložního žen ve vztahu ke gynekologické anamnéze jsme zaznamenali v tabulce I a výskyt *U. urealyticum* a *M. hominis* v tabulce II a III.

U žen, které potratily, byla frekvence výskytu *G. vaginalis* 54,5 %, *U. urealyticum* 54,5 % a *M. hominis* 18,2 %. U žen s léčenou sterilitou jsme zaznamenali 100% výskyt *G. vaginalis* a 50% výskyt *U. urealyticum*. A u žen bez klinické anamnézy jsme izolovali *G. vaginalis* v 44,6 %, *U. urealyticum* v 50,6 % a *M. hominis* v 9,6 % případů.

TABULKA I Výskyt *G. vaginalis* v závislosti na gynekologické anamnéze

Gynekologická anamnéza	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
Samovolné potraty	11	6	54,5
Léčená sterilita	1	1	100
Bez anamnézy	74	33	44,6
Celkem	86	40	

TABULKA II Výskyt *U. urealyticum* v závislosti na gynekologické anamnéze

Gynekologická anamnéza	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
Samovolné potraty	11	6	54,5
Léčená sterilita	2	1	50
Bez anamnézy	83	42	50,6
Celkem	96	49	

TABULKA III Výskyt *M. hominis* v závislosti na gynekologické anamnéze

Gynekologická anamnéza	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
Samovolné potraty	11	2	18,2
Léčená sterilita	2	0	0
Bez anamnézy	83	8	9,6
Celkem	96	10	

Podle klinické symptomatologie jsme pacientky rozdělili do tří skupin:

- 1. skupinu tvořily ženy s prekancerózami, jejichž klinické nálezy byly: H-SIL, L-SIL, CIN I, CIN II, CIN III, HPV, ascus, suspektní cervix, LEEP, praecancerosis cervix.
- 2. skupinu tvořily gravidní ženy.

- Do 3. skupiny žen s ostatními klinickými symptomy jsme zahrnuli pacientky s klinickými nálezy: kontaktní krvácení, metrorrhagia, hypermenorhea, bolesti břicha, suspektní kolpo a cyto, korporální a cervikální polyp.

Výskyt bakterií *G. vaginalis*, *U. urealyticum* a *M. hominis* v souvislosti s klinickou symptomatologií je uvedeno v tabulce IV, V, VI. Nejvyšší frekvenci výskytu *G. vaginalis* (50 %) jsme zaznamenali u gravidních žen, *U. urealyticum* (66,7 %) rovněž u gravidních žen a *M. hominis* (14,9 %) u žen s prekancerózami.

TABULKA IV Výskyt *G. vaginalis* ve stěrech z krčku děložního žen v souvislosti s klinickou symptomatologií

Ženy	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
S prekancerózami	41	20	48,8
Gravidní	12	6	50
S ostatními klinickými symptomy	33	14	42,4
Celkem	86	40	

TABULKA V Výskyt *U. urealyticum* ve stěrech z krčku děložního žen v souvislosti s klinickou symptomatologií

Ženy	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
S prekancerózami	47	23	48,9
Gravidní	15	10	66,7
S ostatními klinickými symptomy	34	15	44,1
Celkem	96	48	

TABULKA VI Výskyt *M.hominis* ve stěrech z krčku děložního žen v souvislosti s klinickou symptomatologií

Ženy	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
S prekancerózami	47	7	14,9
Gravidní	15	2	13,3
S ostatními klinickými symptomy	34	1	2,9
Celkem	96	10	

Podle získaných dat jsme pacientky rozdělili do osmi věkových kategorií. O výskytu bakterií *G. vaginalis*, *U. urealyticum* a *M. hominis* v závislosti na věku pacientky informuje tabulka VII, VIII, IX.

Z údajů uvedených v tabulkách vyplývá, že nejvyšší frekvenci výskytu *G. vaginalis* jsme zjistili u žen ve věkové kategorii 51 – 55 let (83,3 %), *U. urealyticum* u žen ve věkové kategorii 19 – 25 let (66,7 %) a *M. hominis* ve věkové kategorii 46 – 50 let (27,3 %).

TABULKA VII Výskyt *G. vaginalis* ve stěrech z krčku děložního žen v závislosti na věku pacientky

Věk	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
19 - 25 let	11	9	81,8
26 - 30 let	12	2	16,7
31 - 35 let	20	6	30,0
36 - 40 let	12	5	41,7
41 - 45 let	9	5	55,6
46 - 50 let	11	5	45,5
51 - 55 let	6	5	83,3
55 let a více	5	3	60,0
celkem	86	40	

TABULKA VIII Výskyt *U. urealyticum* ve stěrech z krčku děložního žen v závislosti na věku pacientky

Věk	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
19 - 25 let	12	8	66,7
26 - 30 let	14	6	42,9
31 - 35 let	22	12	54,5
36 - 40 let	14	6	42,9
41 - 45 let	12	6	50,0
46 - 50 let	11	4	36,4
51 - 55 let	6	3	50,0
55 let a více	5	3	60,0
celkem	96	48	

TABULKA IX Výskyt *M. hominis* ve stěrech z krčku děložního žen v závislosti na věku pacientky

Věk	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
19 - 25 let	12	3	25,0
26 - 30 let	14	1	7,1
31 - 35 let	22	0	0,0
36 - 40 let	14	1	7,1
41 - 45 let	12	0	0,0
46 - 50 let	11	3	27,3
51 - 55 let	6	1	16,7
55 let a více	5	1	20,0
celkem	96	10	

O výskytu bakterií *G. vaginalis*, *U. urealyticum* a *M. hominis* v souvislosti s druhem používané antikoncepce informuje tabulka X, XI, XII. Z uvedených výsledků je patrné, že u žen používající hormonální antikoncepci byla izolována *G. vaginalis* v 11 případech (35,5 %), *U. urealyticum* v 16 případech (45,7 %) a *M. hominis* ve 3 případech (8,6 %). Zatímco u žen, které nepoužívaly žádnou antikoncepci byla *G. vaginalis* pozitivní v 27 (51,9 %) případech, *U. urealyticum* ve 31 (53,4 %) případech a *M. hominis* v 6 (10,3 %) případech.

TABULKA X Výskyt *G. vaginalis* v závislosti na druhu antikoncepce

Antikoncepce	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
Hormonální	31	11	35,5
Nitroděložní tělísko	3	2	66,7
Bez antikoncepce	52	27	51,9
Celkem	86	40	

TABULKA XI Výskyt *U. urealyticum* v závislosti na druhu antikoncepce

Antikoncepce	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
Hormonální	35	16	45,7
Nitroděložní tělísko	3	1	33,3
Bez antikoncepce	58	31	53,4
Celkem	96	48	

TABULKA XII Výskyt *M. hominis* v závislosti na druhu antikoncepce

Antikoncepce	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
Hormonální	35	3	8,6
Nitroděložní tělísko	3	1	33,3
Bez antikoncepce	58	6	10,3
Celkem	96	10	

Frekvence výskytu nejčastěji se vyskytujících mikroorganismů, které jsme izolovali z krčku děložního uvádí tabulka XIII.

TABULKA XIII Zastoupení mikroorganismů ve stěrech z krčku děložního žen

Mikroorganismus	Počet vzorků	Pozitivních kmenů	%
<i>Gardnerella vaginalis</i>	86	40	46,5
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	96	48	50,0
<i>Mycoplasma hominis</i>	96	10	10,4
<i>Staphylococcus sp.</i>	96	14	14,6
<i>Streptococcus sp.</i>	96	6	6,3
<i>Escherichia coli</i>	96	9	9,4
<i>Candida sp.</i>	96	10	10,4

5. DISKUSE A ZÁVĚR

Gardnerella vaginalis je nejčastěji spojována s onemocněním bakteriální vaginóza. Na patogenezi tohoto onemocnění se však podílí celá řada mikroorganismů, mimo jiné i *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*. Tyto druhy mohou být izolovány z urogenitálního traktu zdravých mužů a žen. Často jsou však dávány do souvislosti s různými zánětlivými onemocněními jakými jsou uretritidy, prostatitidy, salpingitidy a endometritidy. U těhotných žen pak mohou být původci spontánních potratů, předčasných porodů či infekcí novorozenců.

Pro izolaci *G. vaginalis* se nejčastěji používají agarová média obsahující lidskou krev. Po 48 hodinové inkubaci je na agaru s lidskou krví hodnocena morfologie kolonií a především hemolýza v okolí kolonií. Po obarvení bakteriálních buněk dle Grama lze pozorovat gramnegativní až gramlabilní tyčinky.

Greenwood a kol. (1979) stanovili 96% výskyt *G. vaginalis* produkující beta hemolýzu na agarových médiích obsahující lidskou krev. Goldberg a Washington (1976) používali selektivní médium – CNA agar (Columbia-colistin-naladixic acid) pro izolaci *G. vaginalis*. Na tomto agaru obsahujícím kolistin a kyselinu nalidixovou hodnotili výsledky po 48 hodinové inkubaci při 35 °C s 5 % CO₂.

Totten a kol. (1982) používali pro detekci *G. vaginalis* jiná selektivní média. Jedná se především o HB (Human blood Bilayer) a HBT (Human Bilayer Tween) médium. Na těchto médiích izolovali *G. vaginalis* od žen s bakteriální vaginózou a od žen bez klinických projevů.

V naší studii jsme pro identifikaci *G. vaginalis* používali selektivní půdu – GV agar. Půda obsahovala základ pro krevní agar č. 3, suplement A, suplement G, Tween 80 a lidskou krev. Po 48 hodinové inkubaci při 37 °C v prostředí s 5 % CO₂ jsme hodnotili výsledky. V pozitivním případě *G. vaginalis* vyrůstala v drobných šedobílých koloniích obklopených úzkou zónou hemolýzy. Po zhotovení preparátu a jeho obarvení dle Grama, jsme pod mikroskopem pozorovali morfologii bakteriálních buněk. *G. vaginalis* se jevila jako drobná gramnegativní až gramlabilní tyčinka.

Morfologie bakteriálních buněk odpovídá popisu Bednáře a kol. (1996), Votavy a kol. (2003) a Greenwooda a kol. (1980). Testy na průkaz katalázy a oxidázy byly vždy negativní. Piot a kol. (1983) a Greenwood a Picket (1979) prokázali u všech testovaných kmenů negativní výsledek testu na průkaz katalázy.

Na přítomnost *G. vaginalis* jsme celkem testovali 86 stěrů z děložního krčku náhodně vybraných žen. Pozitivní vzorky jsme hodnotili ve vztahu ke gynekologické anamnéze, klinické symptomatologii, věku pacientek a druhu používané antikoncepce. Z uvedeného počtu stěrů z děložního krčku byla *G. vaginalis* izolována ve 40 případech (46,5 %).

Ve vztahu ke gynekologické anamnéze jsme izolovali *G. vaginalis* v 54,5 % případů u pacientek, které samovolně potratily. U pacientek s léčenou sterilitou jsme izolovali *G. vaginalis* ve 100 % případů a u pacientek bez anamnézy ve 44,6 % případů. Z výsledků je patrné, že nejvyšší záchyt *G. vaginalis* byl u pacientek s léčenou sterilitou. Tento výsledek není zcela jednoznačný, neboť počet žen, které jsme s touto anamnézou vyšetřili, byl příliš malý.

Při sledování výskytu *G. vaginalis* v souboru žen s klinickou symptomatologií jsme zaznamenali nejvyšší procento pozitivních případů u gravidních žen (50%). Naopak nejnižší procento pozitivních případů bylo u žen s ostatními klinickými symptomy (42,4 %). U žen s prekancerózami se *G. vaginalis* vyskytovala v 48,8 % případů. *G. vaginalis* izolovali Kristiansen a kol. (1987) u žen s nitroděložní infekcí, Heisterberg a kol. (1987) u žen po potratu s PID, Monif a kol. (1974) u pacientek s poporodní endometritidou po císařském řezu. Gibbs a kol. (1987) detekovali *G. vaginalis* u těhotných žen s infekcí plodové tekutiny. Rempen a kol. (1987) izolovali *G. vaginalis* ze vzorků odebraných od novorozenců.

Při studiu výskytu *G. vaginalis* u žen různých věkových kategorií jsme zjistili největší zastoupení u skupiny žen ve věku 51 - 55 let (83,3 %), u žen ve věku 19 - 25 let jsme zaznamenali rovněž vysoké procento výskytu (81,8 %) a naopak nejmenší zastoupení bylo u žen ve věku 26 - 30 let (16,7 %). Vysoký záchyt *G. vaginalis* u starších žen (51 - 55 let) souvisí se změnami probíhajícími ve vagíně. Po menopauze poševní sliznice atrofuje, ubývá laktobacilů a hodnota pH je neutrální. Z toho vyplývá vyšší náchylnost sliznice ke vzniku infekcí. Vysoký záchyt *G. vaginalis* u mladých žen ve věku 19 - 25 let by mohl pravděpodobně souviset s častým střídáním partnerů.

V závislosti na druhu používané antikoncepce jsme prokázali výskyt *G. vaginalis* u 35,5 % žen s hormonální antikoncepcí a u 51,9 % žen bez antikoncepce. Ženy se zavedeným nitroděložním tělískem byly pozitivní na přítomnost *G. vaginalis* v 66,7 % případů. Tento výsledek není zcela jednoznačný vzhledem k nízkému počtu vyšetřených pacientek. Amsel a kol. (1983) považují za rizikový faktor BV užití nitroděložního tělíska. Prokázali vzájemný vztah mezi použitím nitroděložního tělíska a výskytem *G. vaginalis* a anaerobními bakteriemi. Abdennader a kol. (1990) prokázali spojitost mezi sexuálně přenosným onemocněním a mikroorganismy (především *G. vaginalis*) asociovanými s BV.

Dále jsme hodnotili mikrobiální obrazy poševní (MOP). V souvislosti s výskytem *G. vaginalis* byl nejčastěji (70 %) pozorován MOP II (viz obr. č. 6 v příloze). V preparátu obarveném dle Giemsy jsme pozorovali epitelální buňky hustě pokryté bakteriemi tzv. klíčové buňky (clue cells), přítomnost kokovité mikroflóry a malý počet resp. úplnou absenci laktobacilů. Amsel a kol. (1983) pozorovali klíčové buňky ve vaginálním sekretu u žen s BV. Definovali je jako epitelální buňky pokryté bakteriemi především *G. vaginalis*. Sachdeva a kol. (2006) se ve své studii podrobněji zabývali klíčovými buňkami, jako jedním z kritérií BV. Dospěli k závěru, že *G. vaginalis* je jedním z mikroorganismů, které nejčastěji přilnou k povrchu epitelálních buněk. Ve více jak 20 % jsou klíčové buňky prokazovány v mikroskopických vzorcích žen s BV. Hay a kol. (2005) a Catlin a kol. (1992) rovněž potvrdili, že klíčové buňky jsou důležitým vodítkem pro diagnostiku BV.

Gardnerella vaginalis je často izolována z cervikálních stěrů žen, trpících bakteriální vaginózou. V naší studii jsme prokázali výskyt *G. vaginalis* společně s *U. urealyticum* a *M. hominis*. Rovněž jsme potvrdili spojitost *G. vaginalis* s MOP II.

Pro izolaci *M. hominis* a *U. urealyticum* jsme používali selektivní půdy nazývané PPLO bujón, PPLO agar a komerčně dodávané testy MYCOPLASMA DUO. Výsledky testů MYCOPLASMA DUO se shodovaly s výsledky kultivační metody v tekutých půdách.

Inkubace probíhala 48 - 72 hodin při 37 °C v prostředí s 5 % CO₂. V pozitivním případě došlo v PPLO bujónu a v jamkách mikrotitrační destičky testů ke změně zbarvení média z původně žluté na červenou. Na agarových médiích měly kolonie *M. hominis* a *U. urealyticum* charakteristický vzhled.

M. hominis a *U. urealyticum* jsme prokazovali ve vzorcích 96 stěrů z děložního krčku žen. Pozitivní vzorky jsme hodnotili ve vztahu ke gynekologické anamnéze, klinické symptomatologii, věku patientek a druhu používané antikoncepce. Z uvedeného počtu stěrů bylo *U. urealyticum* prokázáno ve 48 případech (50 %) a *M. hominis* v 10 případech (10,4 %).

Při hodnocení výskytu *U. urealyticum* a *M. hominis* v závislosti na gynekologické anamnéze jsme dospěli k těmto závěrům. U žen, které samovolně potratily, jsme prokázali výskyt *U. urealyticum* u 54,5 % a *M. hominis* u 18,2 % vzorků. Ye a kol. (2004) prokázali 27,6% výskyt *M. hominis* u žen, které spontánně potratily, z čehož vyplývá, že infekce *M. hominis* může být jednou z příčin samovolného potratu. U patientek bez klinické anamnézy jsme zaznamenali 50,6 % případů pozitivních na *U. urealyticum* a 9,6 % případů pozitivních na *M. hominis*. *U. urealyticum* bylo prokázáno u 50 % patientek s léčenou sterilitou. Naopak *M. hominis* jsme u tohoto typu anamnézy neprokázali. Počet žen s touto anamnézou byl příliš malý, tudíž nelze výsledky považovat za zcela průkazné.

Při sledování výskytu *U. urealyticum* na klinické symptomatologii jsme zaznamenali nejvyšší procento pozitivních případů u gravidních žen (66,7 %). Naopak nejnižší procento pozitivních případů bylo u žen s ostatními klinickými symptomy (44,1 %). U žen s prekancerózami se *U. urealyticum* vyskytovala v 48,9 % případů. *M. hominis* jsme zaznamenali u 14,9 % žen s prekancerózami, u 13,3 % gravidních žen a u žen s ostatními klinickými symptomy se vyskytovala ve 2,9 % případů. Rosenstein a kol. (1996) izolovali *M. hominis* u těhotných žen trpících BV. Mardh a kol. (1970) vykultivovali *M. hominis* u žen s PID, Hay a kol. (1994) u žen, které prodělaly samovolný potrat, Cassell a kol. (1983) u žen, které předčasně porodily. Waites a kol. (1990) potvrdili výskyt *M. hominis* u novorozeneckých meningitid. Výskyt *U. urealyticum* zaznamenali Gerber a kol. (2003) u žen, které předčasně porodily a Blanchard a kol. (1993) u novorozenců s pneumonií.

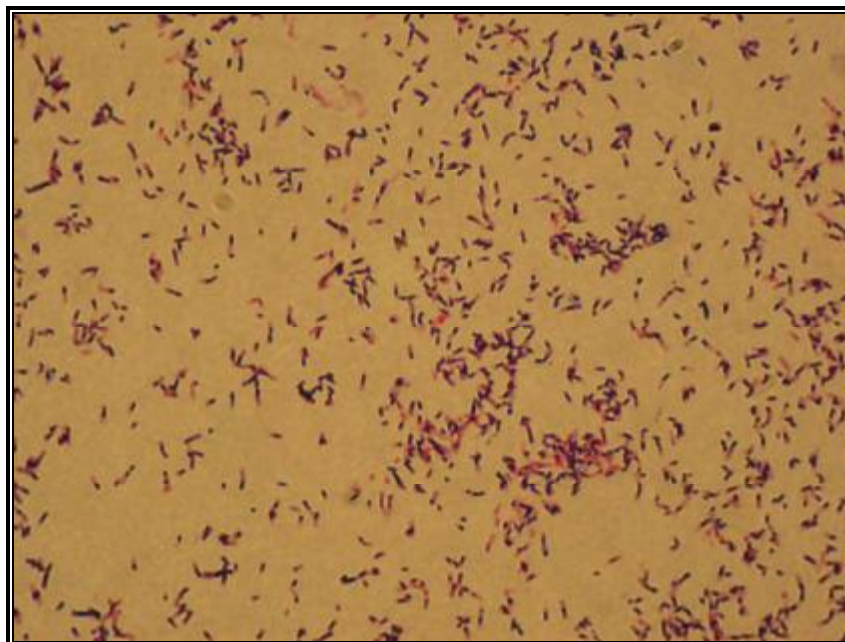
Při hodnocení výskytu *U. urealyticum* a *M. hominis* u žen různých věkových kategorií jsme zjistili největší zastoupení *U. urealyticum* u žen ve věku 19 - 25 let (66,7 %) a *M. hominis* u žen ve věku 46 - 50 let (27,3 %). Naopak nejmenší zastoupení *U. urealyticum* bylo u žen ve věku 46 - 50 let (36,4 %) a *M. hominis* nebylo přítomno ve věkové kategorii 31 - 35 let a 41 - 45 let.

V závislosti na druhu používané antikoncepce jsme prokázali výskyt *U. urealyticum* a *M. hominis* u 33,3 % žen s nitroděložním tělískem. U žen s hormonální antikoncepcí jsme izolovali *U. urealyticum* v 45,7 % a *M. hominis* v 8,6 %. U žen bez antikoncepce jsme zaznamenali 53,4% výskyt *U. urealyticum* a 10,3% výskyt *M. hominis*.

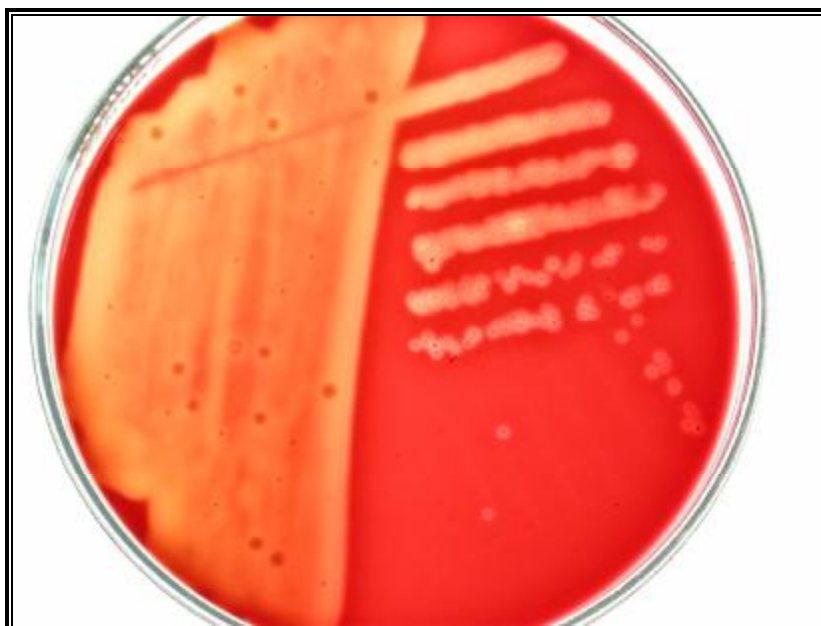
Z výsledků uvedených v této studii vyplývá, že hlavní podíl na vzniku bakteriální vaginózy má především *G. vaginalis*, *U. urealyticum* a *M. hominis*. Dále jsme prokázali mikroorganismy rodu *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Escherichia sp.* a *Candida sp.* Tyto mikroby přispívaly k patogenezi onemocnění celkovým narušením fyziologické poševní mikroflóry. Změnu ve složení poševní mikroflóry jsme také potvrdili vyhodnocením mikrobiálních obrazů poševních, které byly v tomto případě charakteristické absencí laktobacilů a převahou nežádoucích patogenů.

6. PŘÍLOHA

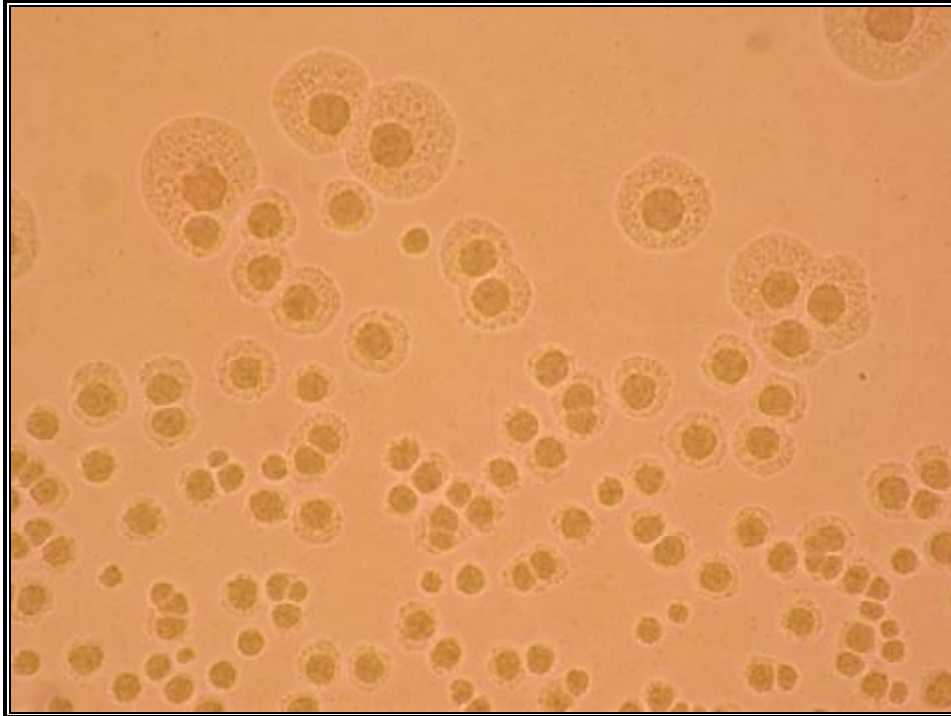
Obr. č. 1: *Gardnerella vaginalis*, nátěr z kultury. Barveno podle Grama (1000x)



Obr. č. 2: Růst a hemolytická aktivita *Gardnerella vaginalis* na agaru s lidskou krví



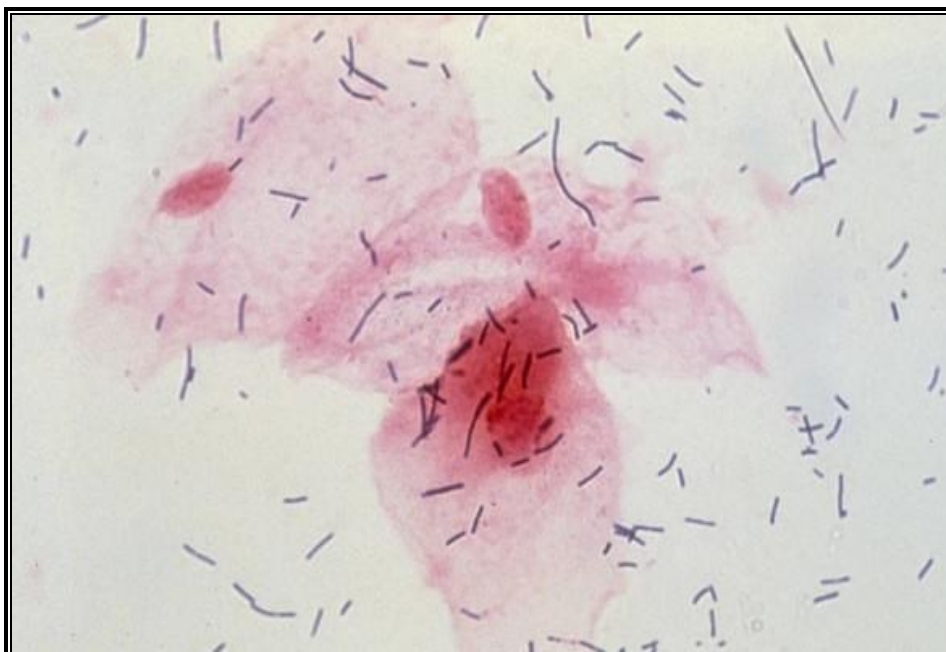
Obr. č. 3: Kolonie *Mycoplasma hominis* s charakteristickým vzhledem „sázeného vejce“ (200x)



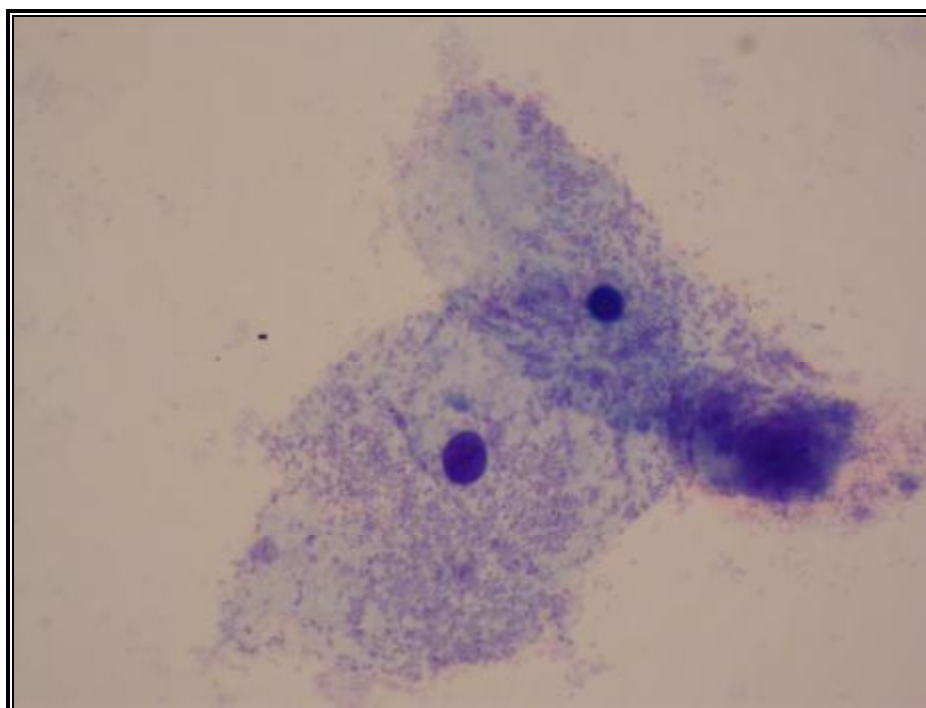
Obr. č. 4: Růst *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* v PPLO bujónu



Obr. č. 5: MOP I. – fyziologický obraz (1000x)



Obr. č. 6: MOP II – nehnisavý výtok (klíčové buňky), (1000x)



7. SEZNAM LITERATURY

Abdennader, S., Casin, I., Brunat, N., Janier, M., Perol, Y., Morel, P.: Sexual transmission of *Gardnerella vaginalis*. Genitourin. Med., 1990, 66: s 45.

Adad, S. J., Vaz de Lima, R., Sawan, Z. T. E., Silva, M. L. G., Hazarabedian de Souza, M. A., Saldanha, J. C., Falco, V. A. A., Hallal da Cunha, A., Murta, E. F. C.: Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida* sp. and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decades. Sao Paulo. Med. J. Rev. Paul. Med., 2001, 119(6): s 200-205.

Aggarwal, A., Devi, P., Jain, R.: Anaerobes in bacterial vaginosis. Indian. J. Med. Microbiol., 2002, 21(2): s 124-126.

Amsel, R., Totten, P. A., Spiegel, C. A., Chen, K. C. S., Eschenbach, D. A., Holmes, K. K.: Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and epidemiologic associations. Am. J. Med., 1983, 74: s 14-22.

Annuk, H., Shchepetova, T., Kullisaar, T., Songisepp, E., Zilmer, M., Mikelsaar, M.: Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. J. Appl. Microbiol., 2003, 94: s 403-412.

Aroutcheva, A., Gariti, D., Simon, M., Shott, S., Faro, J., Simoes, J. A., Gurguis, A., Faro, S.: Defense factors of vaginal lactobacilli. Am. J. Obstet. Gynecol., 2001, 185: s 375-379.

Aslim, B., Kilic, E.: Some Probiotic Properties of Vaginal Lactobacilli Isolated from Healthy Woman. Jpn. J. Infect. Dis., 2006, 59: s 249-253.

Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. : Lékařská mikrobiologie, bakteriologie, virologie, parazitologie. Marvil, Praha, 1996.

Belkum, A., Schee, C., Meijden, W. I., Verbrugh, H. A., Sluiters, H. J. F.: A clinical study on the association of *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma hominis* infections in women attending a sexually transmitted disease (STD) outpatient clinic. FEMS Immun. And Med. Microbiol., 2001, 32: s 27-32.

Blackwell, A. L., Fox, A. R., Philips, I., Barlow, D.: Anaerobic vaginosis (Nonspecific vaginitis): clinical, microbiological and therapeutic findings. The Lancet., 1983, 2: s 1379-1382.

Blanchard, A., Hentschel, J., Duffy, L., Baldus, K., Cassell, G. H.: Detection of *Ureaplasma urealyticum* by polymerase chain reaction in the urogenital tract of adults, in amniotic fluid and in the respiratory tract of newborns. Clin. Infect. Dis., 1993, 17: s 148-153.

Brown, H. L., Fuller, D. D., Jasper, L. T., Davis, T. E., Wright, J. D.: Clinical evaluation of Affirm VPIII in the detection and identification of *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* and *Candida* species in vaginitis/vaginosis. Infect. Dis. Obstet. Gynecol., 2004, 12: s 17-21.

Cassell, G. H., Davis, R. O., Waites, K. B., Brown, M. B., Marriott, P. A., Stagno, S., Davis, J. K.: Isolation of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* from amniotic fluid at 16-20 weeks of gestation: potential effect on outcome of pregnancy. Sex. Transm. Dis., 1983, 10: s 294-302.

Catlin, B. W.: Gardnerella vaginalis: characteristics, clinical considerations, and controversies. Clin. Microbiol. Rev., 1992, 5(3): s 213–237.

Citterbart, K. a kol.: Gynekologie. 1.vyd. Galén, Praha, 2001.

Collins, E. B., Aramaki, K.: Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy. Sci., 1980, 63: s 353-357.

Cook, S. W., Hammill, H. A., Hull, R. A.: Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from female reproductive tract infections and neonatal sepsis. Infect. Dis. Obstet. Gynecol., 2001, 9(4): s 203–207.

Čech, E., Hájek, Z., Maršál, K., Srp, B. a kol.: Porodnictví. Grada Publishing, Praha, 1999.

Čihák, R.: Anatomie 1. Grada Publishing, Praha, 2002.

Devillard , E., Burton, J. P., Reid, G.: Complexity of vaginal microflora as analyzed by PCR denaturing gradient gel electrophoresis in a patient with recurrent bacterial vaginosis. *Infect. Disease in Obstetrics and Gynecology.*, 2005, 13(1): s 25-30.

Eschenbach, D. A., Davick, P. R., Williams, B. L. et al.: Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women with bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1989, 27: s 251-256.

Fluegge, K., Siedler, A., Heinrich, B., Schulte-Moenting, J., Moennig, M. J., Bartels, D. B., Dammann, O., Kries, R., Berner, R.: Incidence and Clinical Presentation of Invasive Neonatal Group B Streptococcal Infections in Germany. *Department of Pediatrics and Adolescent Medicine.*, 2006, 117(6): s 1139-45.

Gardner, H. L., Dukes, C. D.: *Haemophilus vaginalis* vaginitis: A newly defined specific infection previously classified „nonspecific“ vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1955, 69: s 962-976.

Gerber, S., Vial, Y., Hohlfels, P., Witkin, S. S.: Detection of *Ureaplasma urealyticum* in second-trimester amniotic fluid by polymerase chain reaction correlates with subsequent preterm labor and delivery. *J. Infect. Dis.*, 2003, 187: s 518-521.

Gibbs, R. S., Weiner, M. H., Walmer, K., Clair, P. J. S.: Microbiologic and serologic studies of *Gardnerella vaginalis* in intra-amniotic infection. *Obstet. Gynecol.*, 1987, 70: s 187-190.

Goldberg, R. L., Washington, J. A.: Comparison of isolation of *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginale*) from peptone-starch dextrose agar and Columbia colistin-nalidixic agar. *J. Clin. Microbiol.*, 1976, 4: s 245-247.

Gray, K. J., Bennett, S. L., French, N., Phiri, A. J., Graham, S. M.: Invasive Group B Streptococcal Infection in Infants, Malawi. *Emerg. Infect. Dis.*, 2007, 13(2): s 223-9.

Greenwood, J. R., Pickett, M. J.: Salient features of *Haemophilus vaginalis*. J. Clin. Microbiol., 1979, 9: s 200-204.

Gupta, Ch., Briski, L, E.: Comparison of Two Culture Media and Three Sampling Techniques for Sensitive and Rapid Screening of Vaginal Colonization by Group B Streptococcus in Pregnant Women. J. Clin. Microbiol., 2004, 42(9): s 3975-3977.

Hay, P.: Bacterial vaginosis: Vaginal Infections, The Medicine Publishing Company Ltd., 2005, :s 58-61.

Heisterberg, L., Branebjerg, P. E., Bremmelgaard, A., Scheibel, J., Haj, L.: The role of vaginal secretory immunoglobulin A, *Gardnerella vaginalis*, anaerobes and *Chlamydia trachomatis* in postabortal pelvic inflammatory disease. Acta. Obstet. Gynecol. Scand., 1987, 66: s 99-102.

Hillier, S. L., Nugent, R. P., Eschenbach, D. A. at al.: Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. The New England Journal of Medicine., 1995, 333(26): s 1737-1742.

Hunter, C. A., Long, K. R.: A study of the microbiological flora of the vagina. Am. J. Obstet. Gynecol., 1958, 75: s 865-871.

Julák, J.: Úvod do lékařské bakteriologie. Karolinum, Praha, 2006.

Keane, F. E. A., Thomas, B. J., Gildou, C. B., Renton, A., Taylor-Robinson, D.: The association of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* with bacterial vaginosis: observations on heterosexual women and their male partners. International Journal of STD & AIDS., 2000, 11: s 356-360.

Klaban, V.: Ilustrovaný mikrobiologický slovník. 1.vyd. Galén, Praha, 2005.

Kobilková, J. a kol.: Základy gynekologie a porodnictví. 1.vyd. Galén, Praha, 2005.

Kontnick, Ch, M., Edberg, S. C.: Direct Detection of Group B Streptococci from Vaginal Specimens Compared with Quantitative Culture. J. Clin. Microbiol., 1990, 28: s 336-339.

Kristiansen, F. V., Oster, S., Frost, L., Boustouller, Y., Korsager, B., Miller, B. R.: Isolation of *Gardnerella vaginalis* in pure culture from the uterine cavity of patients with irregular bleedings. Br. J. Obstet. Gynaecol, 1987, 94: s 979-984.

Krohn, M. A., Hiller, S. L., Eschenbach, D. A.: Comparison of methods for diagnosing bacterial vaginosis among pregnant women. J. Clin. Microbiol., 1989, 27(6): s 1266-1271.

Lansdell, L. W., Taplin, D., Aldrich, T. E.: Recovery of *Staphylococcus aureus* from multiple body sites in menstruating women. J. Clin. Microbiol., 1984, 20(3): s 307–310.

Levison, M. E., Trestman, I., Quach, R., Sladowski, C., Floro, C. N.: Quantitative bacteriology of vaginal flora in vaginitis. Am. J. Obstet. Gynecol., 1979, 133: s 139-144.

Louvois, J., Hurley, R., Stanley, V, C.: Microbial flora of the lower genital tract during pregnancy: relationship to morbidity. J. Clin. Pathol., 1975, 28(9): s 731–735.

Mardh, P. A., Westrom, L.: Tubal and cervical cultures in acute salpingitis with special reference to *Mycoplasma hominis* and T-strain mycoplasmas. Br. J. Vener. Dis., 1970, 46: s 179-186.

Mašata, J., Jedličková, A.: Infekce v gynekologii a porodnictví a základy jejich antiinfekční léčby. Maxdorf, Praha, 2004.

McLean, N. W., Rosenstein, I. J.: Characterisation and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of woman with recurrent bacterial vaginosis. J. Med. Microbiol., 2000, 49: s 543-552.

Monif, G. R., Carson, H. J.: Female genital tract bacterial coisolates with *Candida albicans* in patients without clinical vaginitis. Infect. Dis. Obstet. Gynecol., 1998, 6(2): s 52-56.

Ness, R. B., Kip, K. E., Hillier, S. L., Soper, D. E., Stamm, C. A., Sweet, R. L., Rice, P., Richter, H. E.: A cluster analysis of Bacterial Vaginosis-associated Microflora and Pelvic Inflammatory Disease. *Am. J. Epidemiol.*, 2005, 162: s 585-590.

Parsonnet, J., Hansmann, M. A., Delaney, M. L., Modern, P. A., DuBois, A. M., Wieland-Alter, W., Wissemann, K. W., Wild, J. E., Jones, M. B., Seymour, J. L., Onderdonk, A. B.: Prevalence of Toxic Shock Syndrome Toxin 1-Producing *Staphylococcus aureus* and the Presence of Antibodies to This Superantigen in Menstruating Women. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, 43: s 4628-4634.

Piot, P., Dyck, E. V.: Isolation and identification of *Gardnerella vaginalis*. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1983, 40: s 15-18.

Pirotta, M. V., Garland, S. M.: Genital *Candida* Species Detected in Samples from Women in Melbourne, Australia, before and after Treatment with Antibiotics. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44: s 3213-3217.

Rempen, A., Martius, J., Hartmann, A. A., Wecker, I.: Transmission rate of *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma* spp., *Gardnerella vaginalis*, B-streptococci, *Candida* spp. and *Chlamydia trachomatis* from the mother to the newborn. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 1987, 241: s 165-170.

Richter, S. S., Galask, R. P., Messer, S. A., Hollis, R. J., Diekema, D. J., Pfaller, M. A.: Antifungal Susceptibilities of *Candida* Species Causing Vulvovaginitis and Epidemiology of Recurrent Cases. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, 43: s 2155-2162.

Rosenstein, I. J., Margan, D. J., Sheehan, M., Lamont, R. F., Taylor, R. D.: Bacterial vaginosis in pregnancy: distribution of bacterial species in different gramstain categories of the vaginal flora. *J. Med. Microbiol.*, 1996, 45: s 120-126.

Rottini, G., Dobrina, A., Forgiarini, O., Nardon, E., Amirante, G. A., Patriarca, P.: Identification and Partial Characterization of a Cytolytic Toxin Produced by *Gardnerella vaginalis*. *Infect. Immun.*, 1990, 58, s: 3751-3758.

Rupp, M. E., Soper, D. E., Archer, G. L.: Colonization of the Female Genital Tract with *Staphylococcus saprophyticus*. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30: s 2975-2979.

Sachdeva, S.: Clue cell. Indian. J. Dermatol. Venereol. Leprol., 2006, 72: s 392-393.

Schlievert, P. M., Case, L. C., Strandberg, K. L., Tripp, T. J., Lin, Y. Ch., Peterson, M. L.: Vaginal *Staphylococcus aureus* Superantigen Profile Shift from 1980 and 1981 to 2003, 2004, and 2005. J. Clin. Microbiol., 2007, 45: s 2704-2707.

Schlicht, M. J., Lovrich, S. D., Sartin, J. S., Karpinsky, P., Callister, S. M., Agger, W. A.: High Prevalence of Genital Mycoplasmas among Sexually Active Young Adults with Urethritis or Cervicitis Symptoms in La Grosse, Wisconsin. J. Clin. Microbiol., 2004, 42: s 4636-4640.

Schrag, S. J., Phil, D., Zywicki, Farley, M. M., Reingold, A. L., Harrison, L. H., M.D., Lefkowitz, L. B., Hadler, J. L., Danila, R., Cieslak, P. R., Schuchat, A.: Group B Streptococcal Disease in the Era of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis, Pediatrics, 2000, 117:s 1139-1145.

Smayevsky, J., Canigia, L. F., Lanza, A., Bianchini H.: Vaginal microflora associated with bacterial vaginosis in nonpregnant women: reliability of sialidase detection. Infect. Dis. Obstet. Gynecol., 2001; 9(1): s 17–22.

Sobel, J. D., Schneider, J., Kaye, D., Levison, M. E.: Adherence of bacterial to vaginal epithelial cells at various times in the menstrual cycle. Infect. Immun., 1981, 32: s 194-197.

Song, Y., Kato, N., Matsumiya, Y., Liu, C., Kato, H., Watanabe, K.: Identification of hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese woman and newborn infants. J. Clin. Microbiol., 1999, 37: s 3062-3094.

Taylor-Robinson, D., McCormack, W. M.: The genital mycoplasmas. N. Engl. J. Med., 1980, 302: s 1003-1010.

Tomas, M. S. J., Brue, E., Nader-Macias, M. E.: Comparison of the growth and hydrogen peroxide production by vaginal probiotic lactobacilli under different culture condition. Am. J. Obstet. Gynecol., 2003, 188: s 35-44.

Totten, P. A., Amsel, R., Hale, J., Piot, P., Holmes, K. K.: Selective Differential Human Blood Bilayer Media for Isolation *Gardnerella (Haemophilus) vaginalis*. J. Clin. Microbiol., 1982, 15: s 141-147.

Votava, M. a kol.: Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, Praha, 2003.

Waites, K. B., Cox, N. R., Crouse, D. T., McIntosh, J. C., Cassell, G. H.: Mycoplasma infections of the central nervous system in humans and animals. In G. Stanek, G. H. Cassell, T.G. Tully, R. F. Whitcomb (ed.), Recent advances in mycoplasmaology. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany., 1990, s 379-386.

Wald, E. R., Dashefsky, B., Green, M., Harger, J., Parise, M., Korey, Ch., Byers, C.: Rapid detection of group B streptococci directly from vaginal swabs. J. Clin. Microbiol., 1987, 25: s 573-574.

Watt, S., Lanotte, P., Mereghetti, L., Moulin-Schouleur, M., Picard, B., Quentin, R.: *Escherichia coli* Strains from Pregnant Women and Neonates: Intraspecies Genetic Distribution and Prevalence of Virulence Factors. J. Clin. Microbiol., 2003, 41: s 1929-1935.

Xie, J., Foxman, B., Zhang, L., Marrs, C. F.: Molecular Epidemiologic Identification of *Escherichia coli* Genes That Are Potentially Involved in Movement of the Organism from the Intestinal Tract to the Vagina and Bladder. J. Clin. Microbiol., 2006, 44: s 2434-2441.

Ye, L. L., Zhang, B. Y., Cao, W. L.: Relationship between endocervical mycoplasma infection and spontaneous abortion due to early embryonic death. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi., 2004, 39(2): s 83-85.

Zinnemann, K., Turner, G. C.: The taxonomic position of *Haemophilus vaginalis (Corynebacterium vaginale)*. J. Pathol. Bacteriol., 1963, 85: s 213-219.