

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

Sára Sošková

Univerzita Pardubice
Fakulta Chemicko-technologická

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

Vaginální mikrobiom

Sára Sošková

Bakalářská práce

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Sára Sošková**
Osobní číslo: **C18277**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Vaginální mikrobiom**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Prostudování odborné literatury a vypracování rešerše zaměřené na vaginální mikrobiom.
2. Mikroorganismy přirozeně se vyskytující na poševní sliznici.
3. Změny vaginální mikroflóry vlivem patogenních mikroorganismů.
4. Vliv ostatních faktorů na vaginální mikrobiom.
5. Porovnání vaginální mikroflóry u žen s vaginálními záněty.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Markéta Vydržalová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Ivana Kusá**
MeDiLa spol. s r.o.
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

LS.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Vaginální mikrobiom jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

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

V Pardubicích dne 7.7.2021

Sošková Sára

PODĚKOVÁNÍ

Velmi děkuji paní RNDr. Markétě Vydržalové, Ph.D., vedoucí této bakalářské práce za ochotu, vstřícnost, pomoc a podporu, kterou mi při jejím vypracování poskytla.

ANOTACE

Práce se zaměřuje na tematiku vaginálního mikrobiomu. Zahrnuje popis jeho složení, výčet faktorů ovlivňující jeho skladbu, a to včetně vlivu hormonálních hladin i patogenních mikroorganismů. Závěr práce je věnován vyšetření mikrobiálního poševního obrazu, s uvedením základních mikrobiologicko-histologických stavů na poševní sliznici ve vztahu k zánětu.

KLÍČOVÁ SLOVA

vaginální mikrobiom, mikroorganismy, laktobacily, eubióza, dysbióza, bakteriální vaginóza

TITLE

Vaginal microbiome

ANNOTATION

This bachelor thesis focuses on the vaginal microbiome. It comprises a description of the microbiome's composition and a list of factors influencing its structure, including hormonal levels and pathogenic microorganisms. The last part of the thesis is devoted to the examination of the microbial vaginal image, with the incorporation of the primary microbiological-histological conditions on the vaginal mucosa in relation to inflammation.

KEYWORDS

Vaginal microbiome, microorganism, Laktobacilli, eubiosis, dysbiosis, bacterial vaginosis

OBSAH

Úvod.....	10
1 Anatomie ženského pohlavního ústrojí.....	11
2 Pochva	12
2.1 Fyziologie poševní sliznice	12
2.2 Vliv hormonálních hladin na mikrobiom.....	16
3 Vaginální mikrobiom a jeho složení	18
4 Podmíněně patogenní mikroorganismy	24
4.1 <i>Gardnerella vaginalis</i>	26
4.2 <i>Atopobium vaginae</i>	28
4.3 Rody <i>Prevotella</i> a <i>Porphyromonas</i>	29
4.4 Anaerobní koky	30
4.5 Rod <i>Sneathia</i>	31
4.6 Rod <i>Mobiluncus</i>	32
5 Patogenní mikroorganismy	33
5.1 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	33
5.2 <i>Treponema pallidum subsp. pallidum</i>	34
5.3 Rody <i>Mykoplasma</i> a <i>Ureaplasma</i>	35
5.4 <i>Chlamydia trachomatis</i>	35
6 Faktory ovlivňující vaginální mikrobiom.....	36
7 Vyšetření vaginálního mikrobiomu	37
7.1 Mikrobiální obraz poševní	37
7.2 Sekvenování	43
8 Závěr	45
9 Použitá literatura	46

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Schéma ženského pohlavního ústrojí	13
Obrázek 2 Sliznice pochvy-mnohovrstevnatý dlaždicový epitel nerohovatějící.....	15
Obrázek 3 Vlastnosti lidské vaginální stratum corneum.....	17
Obrázek 4 Tradiční koncept vaginální mikrobioty.....	20
Obrázek 5 Hlavní typy mikrobiálních společenstev tvořící vaginální mikrobiom.....	22
Obrázek 6 Mechanismy působení bakteriocinů.....	25
Obrázek 7 Vaginální epiteliální buňka infikovaná četným množstvím <i>Gardnerella vaginalis</i> , barvení dle Grama (1000x).....	28
Obrázek 8 <i>Atopobium vaginae</i> , barveno dle Grama (1000x).....	30
Obrázek 9 <i>Prevotella intermedia</i> , barveno dle Grama (1000x).....	31
Obrázek 10 Anaerobní gram pozitivní koky, barvení dle Grama (1000x).....	32
Obrázek 11 <i>Sneathia amnii</i> , obarveno Gramem (1000x).....	33
Obrázek 12 <i>Mobiluncus</i> , barveno dle Grama (1000x).....	34
Obrázek 13 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , barveno dle Grama (1000x).....	35
Obrázek 14 <i>Treponema pallidum</i> , barveno dle Grama (1000x).....	36
Obrázek 15 Mikrobiální obraz poševní I (1500x).....	40
Obrázek 16 Mikrobiální obraz poševní IIa (1500x).....	41
Obrázek 17 Mikrobiální obraz poševní IIb (1500x).....	41
Obrázek 18 Mikrobiální obraz poševní IIb (3000x).....	41
Obrázek 19 Mikrobiální obraz poševní IIIb (1500x).....	42
Obrázek 20 Mikrobiální obraz poševní IV (1500x).....	43
Obrázek 21 Mikrobiální obraz poševní VIa (1500x).....	44
Obrázek 22 Mikrobiální obraz 0-III (1500x), kultivačně <i>E.coli</i> v M-fázi.....	44
Obrázek 23 Profily mikrobiomu.....	46

ÚVOD

Tématem bakalářské práce je problematika vaginálního mikrobiomu. Motivací pro výběr vlastního tématu byl primárně zájem detailněji se obeznámit s touto tematikou, minimálně pro možnost předcházení výskytu nejčastěji hlášeného mikrobiologického syndromu u žen v plodném věku-Bakteriální vaginózy.

Vaginální mikrobiota tvoří specifický ekosystém ženského pohlavního ústrojí. Dominantním rodem je rod *Lactobacillus*, který zajišťuje ochranu před potencionálně patogenními a patogenními mikroorganismy tvorbou kyseliny mléčné. Kyselina mléčná společně s dalšími látkami, jako jsou peroxid vodíku a bakteriociny, zajišťují ochranu poševní sliznice.

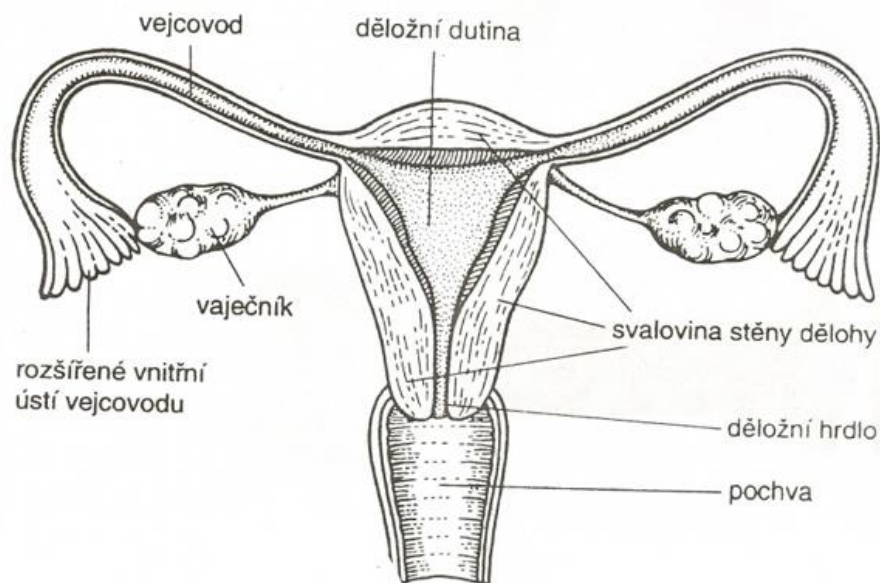
Při poruše ochranné bariéry poševní sliznice dochází ke zmnožení potencionálně patogenních či patogenních mikroorganismu a k rozvoji zánětu. Mezi typické potencionálně patogenní mikroorganismy patří *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, rody *Prevotella* a *Porphyromonas* a další. V mé práci zmiňuji i patogenní organismy, které způsobují onemocnění pohlavního ústrojí ženy jako jsou *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis* a další.

V poslední kapitole se má práce zaměřuje na vyšetření vaginálního mikrobiomu a to zejména na Mikrobiální obraz poševní a metodu sekvenace.

1 ANATOMIE ŽENSKÉHO POHLAVNÍHO ÚSTROJÍ

Ženské pohlavní orgány jsou rozděleny na ženské pohlavní orgány vnitřní a vnější. Vnitřní ženské pohlavní orgány se skládají z párových orgánů: vaječníky, vejcovody a nepárových orgánů: děloha a pochva (viz obrázek č.1). Vnější ženské pohlavní orgány jsou uloženy pod perineální membránou a zároveň za a pod symfýzou. Patří sem: stydký pahorek, velké stydké pysky, malé stydké pysky, poštváček, předsíň poševní a předsíňová bulva [1].

Další z možných dělení je na základě výskytu epitelu jednotlivých částí ženského pohlavního ústrojí. Povrch ovaria je kryt vrstvou cylindrických buněk (dříve nazývaných Waldeyerův germinální epitel) a přechod mezi dlaždicovým epitelem peritonea a cylindrickými buňkami ovaria je označen linií okolo přední hrany ovaria (Waldeyerova linie) [2]. Na ovaria se napojuje tuba uterina, která má na své sliznici epitel cylindrický s řasinkami. Tuba uterina vstupuje do uteru, kde se epitel nemění. Změna epitelu nastává při přechodu uteru a vaginy, ve vagině se nachází mnohvrstevný dlaždicový epitel slizničního typu bez žláz.



Obrázek č. 1 Schéma ženského pohlavního ústrojí

Dostupné z: <https://www.kalisek.cz/zenske-pohlavi-pod-lupou>

2 POCHVA

Pochva je odvodná pohlavní cesta a kopulační orgán. Má tvar trubice, který se kraniálním koncem upíná na děložní hrdlo, kaudálním koncem se otevírá navenek jako ostium vaginae mezi labia minora do tzv. vestibulum vaginae. Stěna pochvy se skládá ze tří vrstev: vazivový obal (adventicie), svalovina, sliznice [3].

2.1 Fyziologie poševní sliznice

Vazivový obal (adventicie)

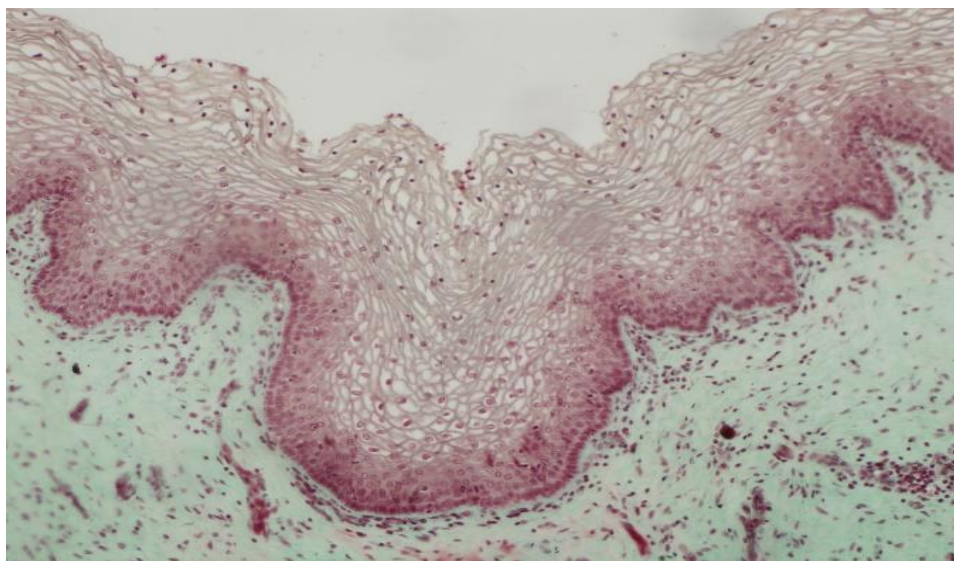
Jedná se o vazivový obal, který plynule přechází do okolního vaziva.

Svalovina

Pochvu tvoří hladká svalovina, která má zevní a vnitřní vrstvu. Zevní vrstva je tvořena podélně probíhajícími snopci. Vnitřní vrstva svaloviny je tvořena převážně cirkulárně orientovanými buněčnými vlákny.

Sliznice

Sliznici pochvy tvoří mnohvrstevný dlaždicový epitel nerohovatějící (viz. Obrázek č.2). Epitel poševní sliznice neobsahuje žádné adnexa, tj. žádné chlupy ani žlázy. Mnohvrstevný dlaždicový epitel nerohovatějící tvoří základní vrstva, která se nazývá bazální membrána, na tuto membránu nasedají epitelové buňky dlaždicového tvaru, které obsahují jádra. Na bazální membránu nasedá jedna vrstva tzv. bazálních buněk, které mají v histologickém řezu velké, poměrně málo se barvící jádro s malým množstvím bazofilně (modře) se barvící cytoplazmy. Následuje 5-8 vrstev buněk parabazálních podobné charakteristiky. Další vrstvy jsou tvořeny tzv. intermediálními buňkami, jejichž jádra se od hloubky k povrchu začínají zmenšovat a jejich obsah zahušťovat (pyknotizovat); plazma přibývá, začíná přijímat i kyselá barviva, čímž dostává nádech červené barvy. Povrchovou vrstvu tvoří tzv. superficiální buňky, velké plachtovité elementy s pyknotickým, jako černá tečka vypadajícím jádrem, a s velkým množstvím eozinofilního (červeně se barvícího) plazmatu [4].



Obrázek č. 2 Sliznice pochvy-mnohovrstevnatý dlaždicový epitel nerohovatějící

Dostupné z:

<https://moodle.lfhk.cuni.cz/moodle2/mod/book/view.php?id=18069&forceview=1>

Epitel vystýlající vaginální sliznici

Povrchové vrstvy lidského vaginálního epitelu, které tvoří rozhraní mezi hostitelem a prostředím, se skládají z mrtvých zploštělých buněk, které prošly programem diferenciací terminálních buněk zvaným cornifikace. To sebou nese vytlačování jader a mezibuněčných organel a vyčerpání funkční DNA a RNA vylučující syntézu nových proteinů. V důsledku toho terminálně diferencované buňky neudrží robustní mezibuněčné spoje a mají sníženou schopnost aktivně reagovat na mikrobiální expozici, přesto vaginální stratum corneum poskytuje účinnou obranu proti invazivním mikrobiálním infekcím.

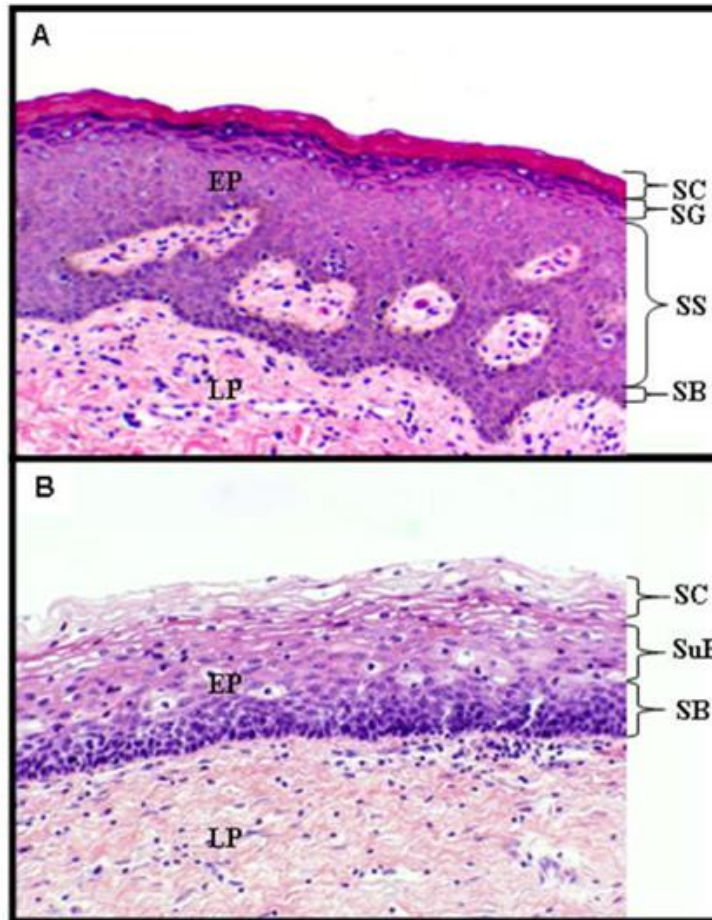
Vaginální stratum corneum se u žen v reprodukčním věku skládá z volně spojených buněk naplněných glykogenem, které jsou propustné pro bakteriální a virové mikroby, stejně jako pro molekulární a buněčné mediátory imunitní obrany. Vaginální stratum corneum poskytuje jedinečné mikroprostředí, které udržuje vaginální zdraví podporou endogenních laktobacilů udržováním kritických mediátorů získané a vrozené imunity.

Lidský vaginální stratifikovaný dlaždicový epitel má velkou plochu až 360 cm² a je prvním povrchem sliznice kontaktovaným sexuálně přenosnými patogeny, a přesto zdravý vaginální epitel obvykle maří pronikání patogenů. Naproti tomu cervix pokrývá jednoduchý cylindrický

epitel, který má mnohem menší povrch, je častým místem infekcí řadou pohlavně přenosných patogenů, včetně *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* a onkogenních kmenů lidských papilomavirů.

Zdravá vaginální sliznice žen v reprodukčním věku se skládá z vrstevnatého plochého epitelu. Epitel prochází diferenciací a obsahuje několik odlišných vrstev: mitoticky aktivní vrstvu = stratum basale, superbazální vrstvu a povrchovou vrstvu zploštělých buněk = stratum corneum (viz obrázek č.3). Vaginální stratum corneum u žen v reprodukčním věku obsahuje velké cytoplazmatické zásoby glykogenu [14].

Struktura vaginálního epitelu se mění po celý život žen a je také ovlivněna hormonálními a enviromentálními podmínkami. U mladých dívek před pubertou je vaginální epitel tenký a skládá se pouze z bazálních a parabazálních vrstev. Během reprodukčních let se vaginální epitel zahušťuje a vytváří zřetelnou zrohovatělou vrstvu. Hormonální vlivy mají mírný vliv na tloušťku vaginálního epitelu, ale ovlivňují i zásoby glykogenu, protože syntéza glykogenu je ovlivněna hladinami estrogenu. Po menopauze se vaginální epitel ztenčuje, zásoby glykogenu se zmenšují a stratum corneum vykazuje různé stupně keratinizace.[14]



Obrázek č. 3 Vlastnosti lidské vaginální stratum corneum

A) Struktura normální lidské epidermis (SB= stratum basale, SS= stratum spinosum, SG= stratum granulosa, SC= stratum corneum)

B) Struktura normálního lidského vaginálního epitelu (SB= stratum basale, SuB= suprabazální vrstva, SC= stratum corneum)

Oba vzorky byly odebrány čerstvé po operaci, fixovány ve formalínu, zalité parafínem, tloušťka řezu je 6 μ m a obarveny hematoxylinem eosinem

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4024347>

2.2 Vliv hormonálních hladin na mikrobiom

Vaječník je párový orgán. Je to místo, v němž ještě intrauterině proběhlo zrací dělení (meióza) a vznikly ženské zárodečné buňky-vajíčka. Ta jsou uložena v korové vrstvě ovaria ve váčcích-folikulech. Buňky folikulů mají schopnost produkovat ženské pohlavní hormony: estrogény (estradiol, estriol, estron), progesteron a v malém množství i androgeny [5].

Estrogény

Estrogény se tvoří v theca interna Grafova folikulu, ve žlutém tělísku, v placentě, v nadledvinách, u mužů ve varlatech a mohou vzniknout i aromatizací androgenů v játrech a v tukové tkáni. Mezi estrogény patří estradiol, estron, estriol. Estrogény jsou ze dvou třetin vázány na plazmatické bílkoviny, zejména na albumin. Dále se v plazmě estrogény váží na SHBG-sex hormone binding globulin neboli globuliny vážící pohlavní hormon [6].

Mezi hlavní fyziologické účinky estrogenů patří:

- Působení na vývoj pohlavních sekundárních znaků
- Navozování proliferační fáze menstruačního cyklu
- Vyvolávání rohovatění epitelu ve vagíně a spolu s kyselým pH brání infekci, ale zároveň i průchodu spermií do dělohy
- Snižování metabolické tolerance glukózy

Progesteron

Progesteron je gestagen, derivát cholesterolu. Vzniká v corpus luteum menstruationis a graviditatis, dále v placentě, nadledvinách a ve varleti. Krví je transportován ve vazbě na transkortin a albumin. [7]

Mezi hlavní fyziologické účinky progesteronu patří:

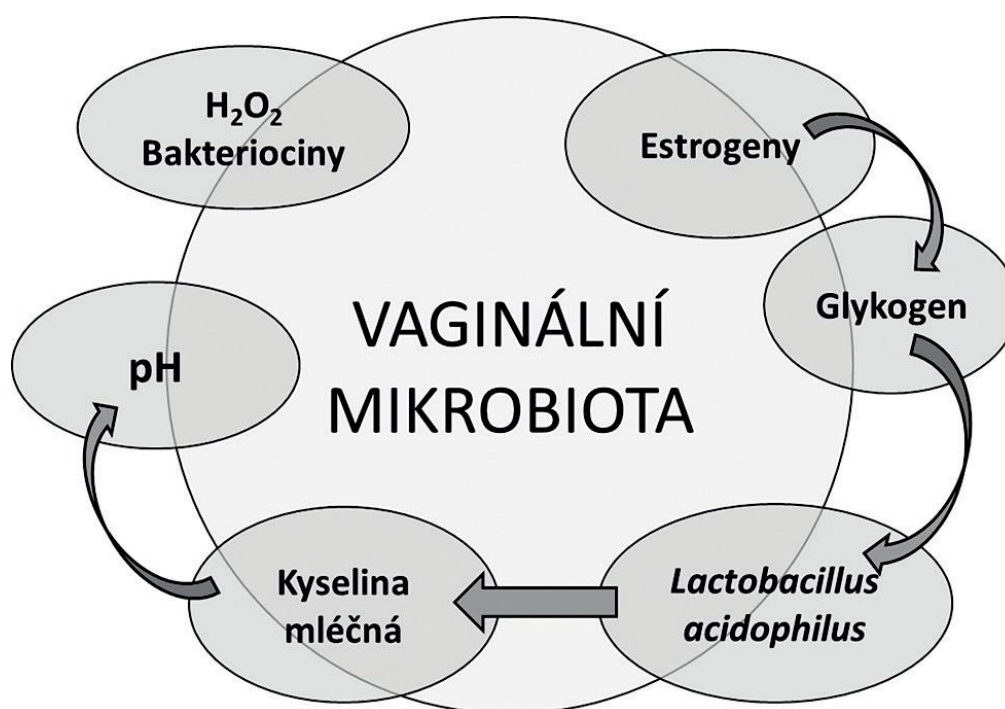
- Působení na endometrium v sekreční fázi
- Vliv na zahuštění hlenu v cervixu
- Snižování citlivosti myometria k oxytocinu

Estrogen stoupá během puberty a souvisí se zvýšeným ukládáním glykogenu ve vaginálních epiteliálních buňkách. Glykogen je uvolňován z vaginálních epiteliálních buněk prostřednictvím enzymů MMP-8 a hyaluronidázy-1, dále buněčnou lýzou působením vysokých koncentrací kyseliny mléčné a cytolysinů degradujících membránu produkovaných laktobacily. Přítomnost laktobacilů silně koreluje s nízkým vaginálním pH a hladinami glykogenu, přičemž

vyšší hladiny glykogenu odpovídají častějšímu výskytu druhů *L.crispatus* a *L.jensenii*, než *L.iners* [16].

3 VAGINÁLNÍ MIKROBIOM A JEHO SLOŽENÍ

Vaginální eubióza je charakterizovaná přítomností mikroorganismů produkujících kyselinu mléčnou převážně rodu *Lactobacillus*. Laktobacily přirozeně se vyskytující nebo podávány jako probiotika, ovlivňují vaginální eubiózu usmrcením dysbiotických mikrobů a mnoha druhů patogenů pomocí kyseliny mléčné. Sliznice pochvy a děložního hrdla je kolonizována mikroorganismy s účinkem komenzálním, symbiotickým nebo parazitickým. Složení vaginálního mikrobiomu se liší podle kulturních a genetických faktorů. Kavkazské ženy jsou převážně kolonizovány *L. crispatus*, zatímco africké a hispánské ženy bývají kolonizovány převážně *L. iners*. Stabilitu vaginálního mikrobiomu mohou narušit jednak vnitřní fyziologické procesy v těle např. hladina pohlavních hormonů, menstruace, tak i vnější faktory např. pohlavní styk, intimní hygiena. Vaginální eubióza zahrnuje souhru mnoha faktorů (viz obrázek č.4) [16].



Obrázek č. 4 - Tradiční koncept vaginální mikrobioty

Dostupné z: Doc.RNDr. Vladimír Buchta. Vaginální mikrobiom: Vaginal microbiome. *Česká gynekologie*. 2018, 371-379.

K získání vaginálního mikrobiomu dochází krátce po nebo během porodu. Při vaginálním porodu je novorozenec vystaven různorodému spektru mikrobů, včetně těch, které se vyskytují v porodních cestách matky. Novorozenci získávají svou počáteční mikrobiotu z pochvy a exkrementů svých matek, kterým jsou vystaveni během porodu. Dominguez-Bello a kolektiv (2010) použili cílené 16S rRNA genové sekvenování k prokázání, že novorozenci, kteří přišli na svět vaginální cestou získávají bohaté mikrobiální společenství. Tvoří ho bakterie z kůže, úst, nosohltanu, střev a vaginálního prostředí. Z vaginálního mikrobiomu jsou novorozenci kolonizováni rody *Lactobacillus*, *Prevotella* nebo *Sneathia*. Zatímco novorozenci, kteří se narodili císařským řezem jsou kolonizováni bakteriemi, které se vyskytují převážně na kůži, v nichž dominují rody *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* a další [24].

U zdravých žen v reprodukčním věku vaginální mikrobiom obecně vykazuje převahu rodu *Lactobacillus* a většina žen vykazuje prevalenci jednoho druhu mezi *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* a *L. gasseri* [8].

Rod *Lactobacillus*

Zástupci rodu *Lactobacillus* tvoří základ zdravé poševní mikroflóry. Poprvé byly identifikovány ve vaginálním sekretu na konci 19. století Albertem Dönderleinem [11]. Většina druhů rodu *Lactobacillus* fermentuje glukosu a laktosu na laktát. Odtud pochází jméno tohoto rodu. Náleží sem druhy bakterií, které tvoří část přirozené mikroflóry úst člověka, gastrointestinálního traktu a vaginy, a jsou jen vzácně patogenní. Přesto jsou uváděny např. jako původci endokarditid, novorozeneckých meningitid, chorioamnionitid či endometritid. Nejčastěji izolovaným druhem je *Lactobacillus acidophilus* [10].

U žen ve fertilním věku jsou příslušníci rodu *Lactobacillus* převážnou částí poševní mikroflóry a nejvýznamnějším prvkem bránicím ascendentnímu pronikání infekce do dělohy. Nejčastěji jde o *L. acidophilus* (v minulosti a v klinice běžně nazývaný Döderleinův bacil). Laktobacily ve vagíně využívají glykogen, který se uvolňuje z rozpadajících se epitelů. Jeho štěpením za vzniku laktátu vzniká kyselé prostředí (hodnota pH se pohybuje kolem 4,5), což brání v osídlení vaginy patogenními a potenciálně patogenními mikroorganismy [10].

Charakteristika rodu:

- Laktobacily jsou robustní grampozitivní tyčinky-často tvořící řetízky

- Jsou součástí přirozené mikroflóry dutiny ústní, trávicího traktu a vaginy
- Většina laktobacilů je mikroaerofilní
- Laktobacily jsou významné svou probiotickou funkcí a jako takové jsou využívány ve formě různých doplňků [11]

Lactobacillus crispatus byl dříve považován za jeden z nejběžnějších druhů laktobacilů v pochvě. Nejčastěji vyskytujícím se druhem je *L. iners* [11].

Ačkoliv prevalence druhu *Lactobacillus sp.* je nejčastějším znakem zdravého mikrobiomu, významná část zjevně zdravých žen má vaginální bakteriální společenství, která postrádají znatelný počet druhu *Lactobacillus sp.*, ale zahrnují rozmanitou škálu fakultativně anaerobních nebo přísně anaerobních bakterií, které jsou obvykle spojovány s mírně zvýšeným pH. Tyto mikrobioty zahrnují členy rodu *Atopobium*, *Corynebacterium*, *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Prevotella*, *Mobiluncus*, *Gardnerella* a *Sneathia* (viz obrázek č.5). Členové těchto rodů jsou obvykle spojováni s dysbiotickým nebo patologickým stavem [19].

	Komunitní typ společenství					
	Skupina I	Skupina II	Skupina III	Skupina IV-A	Skupina IV-B	Skupina V
Hlavní mikroby	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus iners</i>	<i>Anaerococcus</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Fingoldia</i> <i>Streptococcus</i>	<i>Atopobium</i> <i>Prevotella</i> <i>Paryimonas</i> <i>Sneathia</i> <i>Gardnerella</i> <i>Mobiluncus</i> <i>Peptoniphilus</i>	<i>Lactobacillus jensenii</i>
Vedlejší mikroby	<i>L. jensenii</i> <i>Prevotella</i>	<i>Prevotella</i>	<i>L. jensenii</i> <i>Prevotella</i>	<i>L. crispatus</i> , <i>L. iners</i> <i>Lactobacillus spp.</i>		<i>Prevotella</i>
Diverzita	nízká	nízká	nízká	vysoká		nízká
pH	4,0-4,5	4,5-5,5	4,0-5,0	4,7-5,9		4,3-5,1
Etnikum**						
Kavkazské	+++	(+)	++	+		(+)
Hispanšské	+	(+)	+++	+++		(+)
Asijské	++	(+)	+++	++		(+)
Africké	++	(+)	+++	+++		(+)

Obrázek.č5 Hlavní typy mikrobiálních společenstev tvořící vaginální mikrobiom

Dostupné z: Doc.RNDr. Vladimír Buchta. Vaginální mikrobiom: Vaginal microbiome. *Česká gynekologie*. 2018, 371-379.

Druhy *Lactobacillus sp.* se liší ve své schopnosti vylučovat jiné bakterie a *L. iners* je druh, který nejčastěji koexistuje s jinými potencionálně patogenními mikroorganismy. Pochopení interakcí mezi bakteriálními druhy a hostitelem je nezbytné pro pochopení vaginálního mikrobiomu [21].

U premenopauzálních žen byly navrženy dvě strategie, které vysvětlují, jak laktobacily inhibují růst dalších mikroorganismů ve vagíně:

1. Kompetitivní vyloučení prostřednictvím adherence k vaginálním epiteliálním buňkám
2. Produkce antimikrobiálních látek, jako jsou například bakteriociny, peroxid vodíku a kyselina mléčná

Předpokládá se, že druhy *Lactobacillus sp.* soutěží o vazbu na receptory na hostitelských epiteliálních buňkách. Je dokázáno že *Lactobacillus sp.* může inhibovat adherenci různých urogenitálních patogenů, včetně druhů *Streptococcus* skupiny B, *Staphylococcus aureus*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Klebsiella penumonie* [21]

Složení vaginálních bakteriálních komunit se dramaticky liší mezi ženami v reprodukčním věku různých etnických skupin. Ravel a kolektiv (2011) analyzovali vzorky od 396 asymptomatických žen a identifikovali 5 komunit: *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* a jiné přísně anaerobní bakterie. Zjistili, že u 80-90 % Asiatek a bělošek převažuje druh *Lactobacillus*. Naproti tomu u Černošek a hispánek je toto procento okolo 60 %. Tento rozdíl ve složení se projevuje také na jiné hodnotě pH, Hispánky a černošky mají vyšší pH než Bělošky a asiátky [24].

Kyselina mléčná

Kyselina mléčná vzniká fermentací glukózy laktobacily. V přítomnosti *L. crispatus* vykazuje poševní sekret nejvyšší kyselost ve srovnání s *L. iners*, *L. jensenii* a *L. gasseri*. U žen s mikroflórou ovládanou laktobacily je koncentrace kyseliny mléčné nepřímo spojována s pH, což naznačuje, že kyselina mléčná je primárně zodpovědná za okyselení pochvy. Vaginální kyselina mléčná existuje jako 1- α -D- izomery, 85 % vytváří laktobacily a zbylých 15 % je kyselina mléčná produkována vaginálními epiteliálními buňkami ovšem ve formě L-izomeru.

Poměr D a L izomeru kyseliny mléčné je charakteristický pro jednotlivé druhy laktobacilů. *L. crispatus* vykazuje vyšší ochranu ve srovnání s *L. iners* proti patogenům [16].

Kyselina mléčná má antimikrobiální účinek. Na rozdíl od laktátu je kyselina mléčná schopna prostupovat do buněk bez použití monokarboxylátových transportérů nebo receptoru GPR81, které běžně váží laktát. Při vstupu kyselina mléčná okyseluje cytosol většiny bakterií, interferuje s intracelulárními složkami bakterie a vede k buněčné smrti [16].

Kyselina mléčná je aktivní proti bakteriálním patogenům např. *Chlamydia trachomatis* a *Neisseria gonorrhoeae*, ale také i *E. coli* [13].

O'Hanlon a kol. (2011) zjistili, že kyselina mléčná snižuje životaschopnost skupiny bakterií spojených s BV. Graver a kol. (2011) zjistili, že v kokultivačních experimentech druhy *Lactobacillus* produkující kyselinu mléčnou inhibovaly růst *N. gonorrhoeae*.

Peroxid vodíku

Na rozdíl od kyseliny mléčné a kyselého pH role peroxidu vodíku zůstává do značné míry kontroverzní. Reálné změny poševní sliznice pro tvorbu a stabilitu peroxidu vodíku nejsou optimální, protože zde panuje silně hypoxické prostředí. Navíc, samotná vaginální tekutina má výraznou antioxidační aktivitu a samotné laktobacily nevynikají přílišnou odolností vůči peroxidu vodíku. V praxi může být obtížné vždy oddělit účinek laktátu od peroxidu vodíku u zdravých žen, protože ty jsou obvykle osídleny H_2O_2 -produkujícími kmeny laktobacilů, jako je *L. crispatus*. Ani klinické studie do této problematiky nevněsly více světla, i když v jedné z nich více než polovina žen s BV reagovala pozitivně na výplach 3% peroxidem vodíku. Kontroverze kolem účinku peroxidu vodíku na bakterie, ale podobně i na kvasinky tak zůstávají. To může být do značné míry dáno skutečností, že většina studií historicky pracovala s *L. acidophilus*, který, jak dnes víme je komplexem více druhů [17].

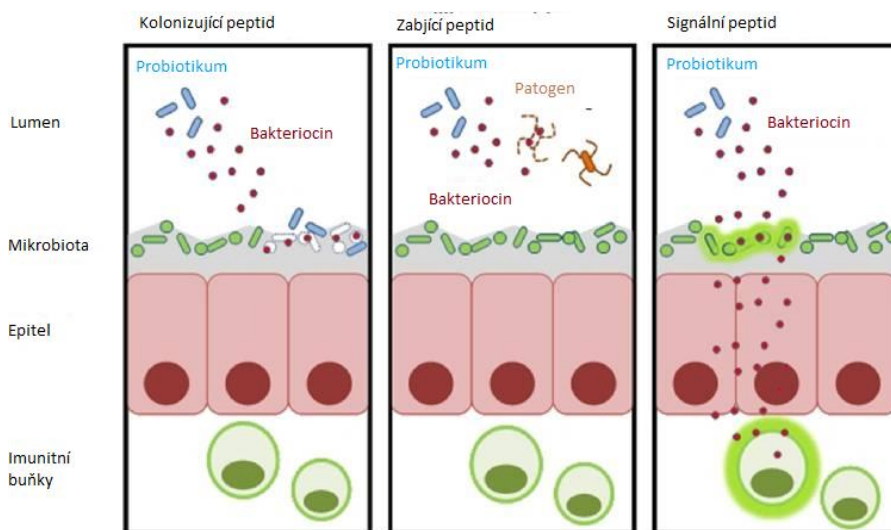
Absence H_2O_2 produkující laktobacily se spojuje s několika patologickými procesy ve vagině. Může docházet k vaginální kolonizaci *E. coli*, u těhotných žen může vést k předčasnému porodu a také bývá dáváno do souvislosti s endometriózou [21].

Bakteriociny

Bakteriociny jsou bílkovinné baktericidní látky syntetizované bakteriemi, které mají úzké spektrum aktivity. Jejich antimikrobiální aktivita je obvykle založena na permeabilizaci membrány cílové buňky. V pochvě mohou bakteriociny hrát hlavní roli v potlačení růstu patogenních mikroorganismů. [13].

Bakteriociny jsou hojnou a různorodou skupinou ribozomálně syntetizovaných antimikrobiálních peptidů produkovaných bakteriemi a archeami. Většina bakterií produkuje alespoň jeden bakteriocin. Bakteriociny přispívají k probiotické funkci, mohou fungovat jako kolonizující peptidy, signální peptidy, antimikrobiální peptidy a zabíjecí peptidy (viz obrázek č.6). Mohou také přímo inhibovat patogeny na sliznici [18].

U laktobacilů byly identifikovány nejméně dva bakteriociny. Ukázalo se, že jeden z identifikovaných bakteriocinů, laktocin 160, cílí na cytoplazmatickou membránu *G. vaginalis*, což naznačuje, že je pravděpodobně biologicky relevantním obranným mechanismem [21].



Obrázek č. 6 Mechanismy působení bakteriocinů

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3255625/>

4 PODMÍNĚNĚ PATOGENNÍ MIKROORGANISMY

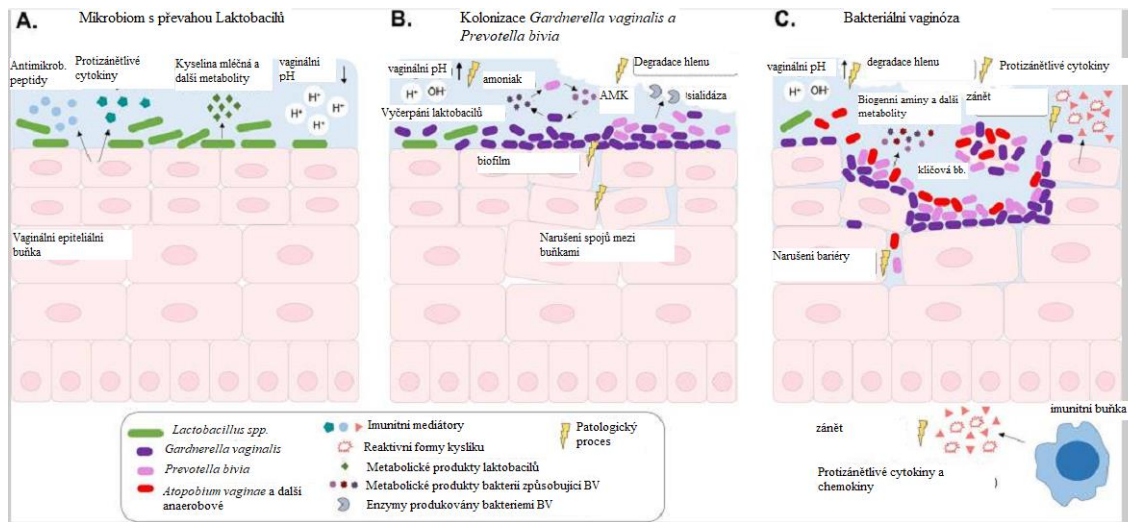
Bakteriální vaginóza

Bakteriální vaginóza (BV) je nejčastěji hlášeným mikrobiologickým syndromem u žen v plodném věku. BV je charakterizována posunem vaginální flóry s převahou laktobacilů na polymikrobiální flóru. BV je spojována s celou řadou zdravotních problémů, včetně předčasných porodů, zánětlivých onemocnění pánve, zvýšené náchylnosti k infekci HIV. Do procesu onemocnění může být zapojena celá řada potenciálních mikrobiálních patogenů, které se vyskytují jednotlivě nebo v kombinaci. Seznam možných agens se stále rozšiřuje a zahrnuje členy rodů *Gardnerella*, *Atopobium*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Mobiluncus*, *Sneathia*, *Leptotrichia*, *Mycoplasma*[20].

Záněty pochvy se projevují různými příznaky, mohou být spojeny s bolestí, svěděním, pocitem pálení, nepohodlí a vaginálním výtokem s prokazatelnými zánětlivými mediátory nebo bez nich. Pokud je přítomen specifický patogen, je vaginitida obvykle pojmenována po infekčním agens. Pokud jsou však se souborem příznaků spojeny nespecifické změny ve vaginálním mikrobiomu, je obtížnější poskytnout smysluplnou popisnou terminologii [20].

Kritéria po diagnostiku BV:

- vaginální výtok s pH > 4,5
- přítomnost homogenního výtoku
- rybí, těkavý, aminový zápach
- přítomnost skvamózních epitelálních buněk potažených bakteriemi



Legenda – Fyziologické a imunologické změny při BV

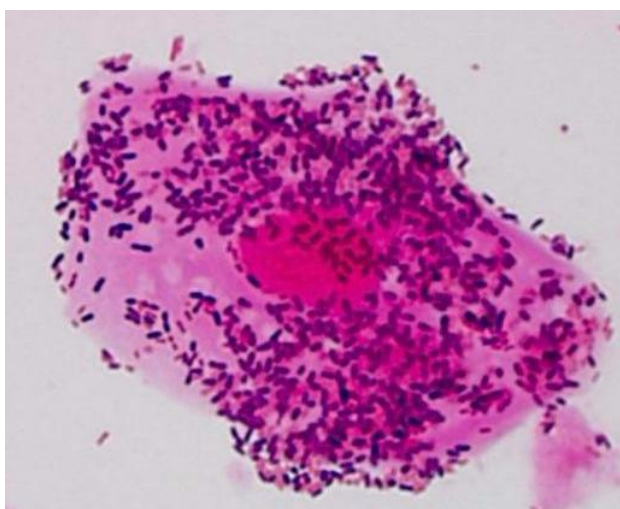
- A) Ve zdravém stavu dominují ve vaginálním mikrobiomu druhy *Lactobacillus*-produkce kyseliny mléčné vede ke snížení hodnoty pH = ochrana před patogeny. Epiteliální buňky produkují nízké hladiny antimikrobiálních peptidů a cytokinů.
- B) Vaginální dysbióza začíná počáteční kolonizací fakultativním anaerobem *Gardnerella vaginalis*, obvykle po sexuální expozici. *Gardnerella vaginalis* kolonizuje vaginální epitelální buňky, nahrazuje laktobacily a poskytuje lešení pro tvorbu biofilmu. Následně dochází k další infekční dávce *Gardnerella vaginalis* a *Prevotella bivia*, tyto mikroby se váží na vznikající biofilm. *G. vaginalis* a *P. bivia* si navzájem podporují růst prostřednictvím metabolismu amoniaku a AMK. Obě bakterie produkují sialidázu, která způsobuje degradaci hlenu a narušení bariéry.
- C) Ostatní sekundární kolonizátoři např. *Atopobium vaginae* a *Sneathia spp.*, jsou přijati na biofilm. V této fázi dochází k exfoliaci buněk potažených biofilmem. Epiteliální buňky a získané imunitní buňky produkují protizánětlivé cytokiny a chemokiny, které mohou vést k zánětu genitálií.

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7265982/>

4.1 *Gardnerella vaginalis*

Gardnerella vaginalis byla poprvé izolována v roce 1953. O rok později ji Gardner a Dukes dali do souvislosti s nescifickou bakteriální vaginitidou a tuto bakterii pojmenovali *Haemophilus vaginalis*. Později byla gardnerela zařazena do rodu *Corynebacterium* na základě metabolismu a morfologie bakteriálních buněk po obarvení dle Grama. Po dalších analýzách, podpořených hybridizací DNA byla tato bakterie umístěna do vlastního rodu *Gardnerella*. *Gardnerella* je z čeledi *Bifidobacteriaceae*. Buňky jsou malé, nepohyblivé, nesporulující, bez pouzdra, pleomorfní tyčinky s průměrnými rozměry 0,4 až 1,5 μm . Po obarvení dle Grama se mohou jevit jako Gram labilní, a to díky tenké vrstvě peptidoglykanu. *Gardnerella vaginalis* je kultivačně náročný mikroorganismus, který ke svému růstu vyžaduje komplexní médium a nejlépe roste v přítomnosti oxidu uhličitého. *Gardnerella vaginalis* je negativní na katalázu, oxidázu β -glukosidázu. Buněčný povrch je pokryt fimbriemi, které jsou zodpovědné za přilnutí gardnerel k epiteliálním buňkám [20].

Schopnost *G. vaginalis* přilnout k vaginálním epiteliálním buňkám poskytuje základ pro tvorbu biofilmu (viz obrázek č.7), který vytváří vhodné prostředí pro další bakterie, které se mohou podílet na BV, jako je *Atopobium vaginae*. *G. vaginalis* a *Atopobium vaginae* byly detekovány společně ve vaginálních biofilmech. Tvorba biofilmu je klíčem k rozvoji onemocnění, protože poskytuje zvýšenou toleranci vůči antibiotikům, imunitní obraně hostitele, čímž může onemocnění přejít do chronicity nebo může docházet k recidivám [20].



Obrázek č. 7 Vaginální epiteliální buňka infikovaná četným množstvím *Gardnerella vaginalis*, barvení dle Grama (1000x)

Dostupné z: <https://blog.hardydiagnostics.com/2017/09/does-gardnerella-vaginalis-play-an-important-role-in-urinary-tract-infections/>

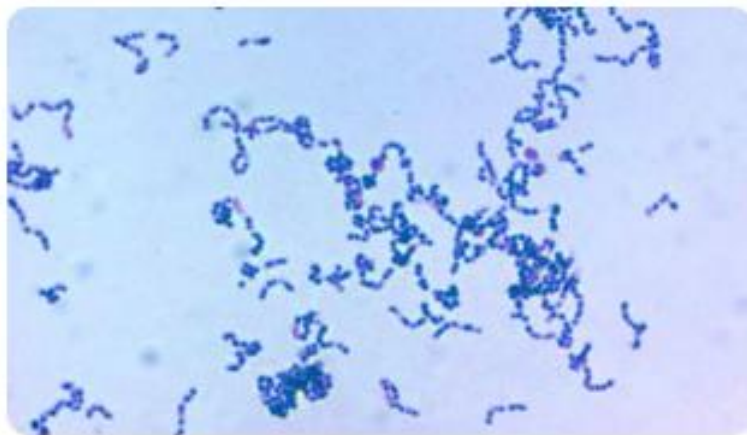
G. vaginalis se vyskytuje jak u žen s BV, tak i u žen, které nemají akutní příznaky BV a jsou bezpříznakové. *G. vaginalis* může být detekována u partnerů žen s BV, což naznačuje možnost sexuálního přenosu [20].

Mezi faktory virulence *G. vaginalis* jsou řazeny adheziny, které jsou podobné adhesinům prokazovaným u Mykoplasmát. Dalšími faktory virulence produkovaným *G. vaginalis* jsou cytolysiny, které způsobují buněčnou smrt aktivací dráhy proteinkinázy v lidských epiteliálních buňkách. Mezi nejlépe prostudované cytolysiny patří vaginolysin, toxin, lyzující vaginální epiteliální buňky [20].

4.2 *Atopobium vaginae*

Atopobium vaginae bylo poprvé spojené s BV v roce 2004. Bakterie *A. vaginae* jsou anaerobní, malé, gramnegativní koky, které se vyskytují jednotlivě, ve dvojicích nebo v krátkých řetězcích (viz obrázek č.8). Tato variabilní morfologie buněk může vysvětlit, jak mohou být *A. vaginae* maskovány jinými organismy a přehlíženy při diagnostickém Gramově barvení. Na KA tvoří *A. vaginae* drobné kolonie. Hlavním metabolickým produktem je kyselina mléčná. *A. vaginae* bylo prokázáno metodou PCR u 96 % žen s BV, a pouze u 12-19 % žen bez BV. *A. vaginae* je dáváno do souvislosti s příznaky BV jako je zvýšené pH a přítomnost klíčových buněk v MOP. Celkem bylo *A. vaginae* prokázáno v 70 % vzorků od žen s BV. [20].

Spolu s *G. vaginalis* a *Prevotella bivia* se *A. vaginae* ukázalo jako silný spouštěč zánětu. Aktivuje hlavní protizánětlivý transkripční faktor NF-Kb v cervikovaginálních epiteliálních buňkách [20].



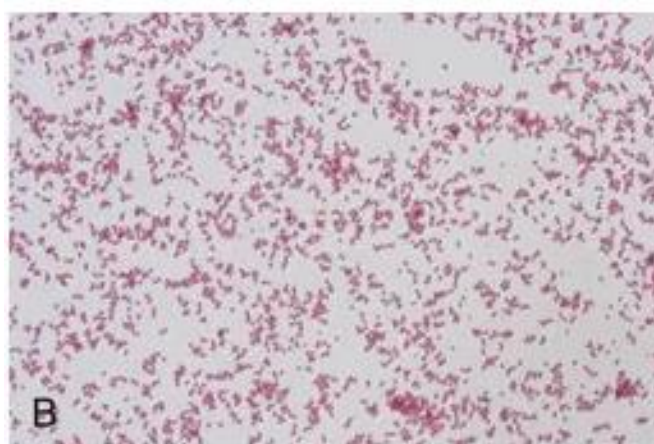
Obrázek č.8 *Atopobium vaginae*, barveno dle Grama (1000x)

Dostupné z: <https://d-nb.info/1184557314/34>

4.3 Rody *Prevotella* a *Porphyromonas*

Rod *Prevotella* a *Porphyromonas* jsou anaerobní, gramnegativní, pleomorfní, nepohyblivé tyčinky, které byly dříve klasifikovány jako rod *Bacteroides* (viz obrázek č.9). Tyto rody zahrnují jak nepigmentované druhy *Prevotella* tak i černě pigmentované druhy-*Prevotella* a *Porphyromonas*. Bylo zjištěno, že tyto druhy se pomocí Gramova barvení, kultivace a molekulárních technik vyskytují prakticky u všech žen s BV.

Výskytu zástupců rodu *Prevotella* je spojena s pozitivním testem na zápach. Pozitivní test je přičítán produkci polyaminů, včetně putrescinu, kadaverinu a trimethylaminu. Aminy produkované rodem *Prevotella* zvyšují pH, což má za následek pomnožení dalších patogenních mikroorganismů v pochvě. Je prokázáno, že produkce amoniaku prevotelou zvyšuje růst *G. vaginalis*, která produkuje aminokyseliny. Kromě těchto polyaminů *Prevotella bivia* a *Prevotella disiens* produkují kolagenázu a fibrinoliziny, které mohou degradovat povrch sliznice a podporovat oddělení vaginálních epiteliálních buněk. Taktéž produkují sialidázu a prolidázu, které způsobují odlupování vaginálních epiteliálních buněk [20].



Obrázek č.9 *Prevotella intermedia*, barveno dle Grama (1000x)

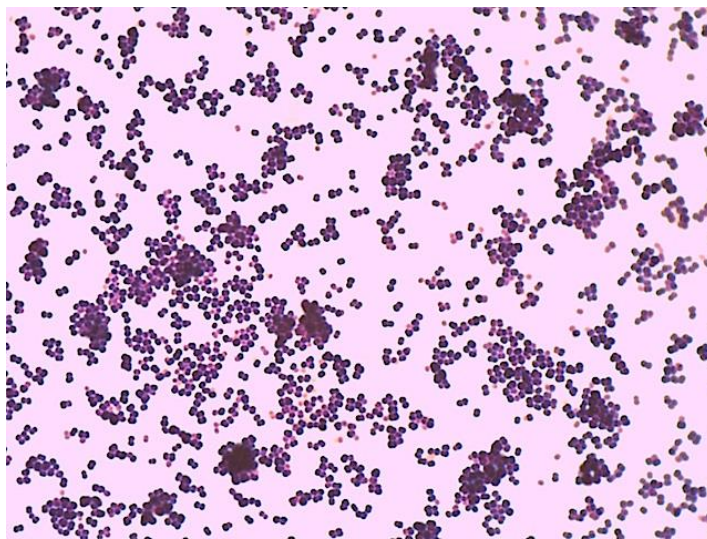
Dostupné z: <https://oncohemakey.com/bacteroides-prevotella-porphyromonas-and-fusobacterium-species-and-other-medically-important-anaerobic-gram-negative-bacilli/>

4.4 Anaerobní koky

Anaerobní grampozitivní koky jsou součástí mikroflóry kůže a sliznic (viz obrázek č.10). Patří zde rody *Fingoldia*, *Parvimonas*, *Gallicola*, *Peptoniphilus* a *Anaerococcus*. Zástupci těchto rodů se mohou vyskytovat na povrchu sliznic jak u žen s BV, tak u žen bez příznaků BV. Citlivost k antibakteriálním léčivům se u jednotlivých rodů liší.

Molekulárně biologickými metodami byl prokázán rod *Megasphaera* se dvěma fylotipy *Megasphaera* typy 1 a 2. Tyto fylotypy byly detekovány jak u žen s BV, tak u těch bez BV.

Role vaginálních anaerobních koků ve vaginální slizniční imunitě nebyla dosud objasněna. [20].



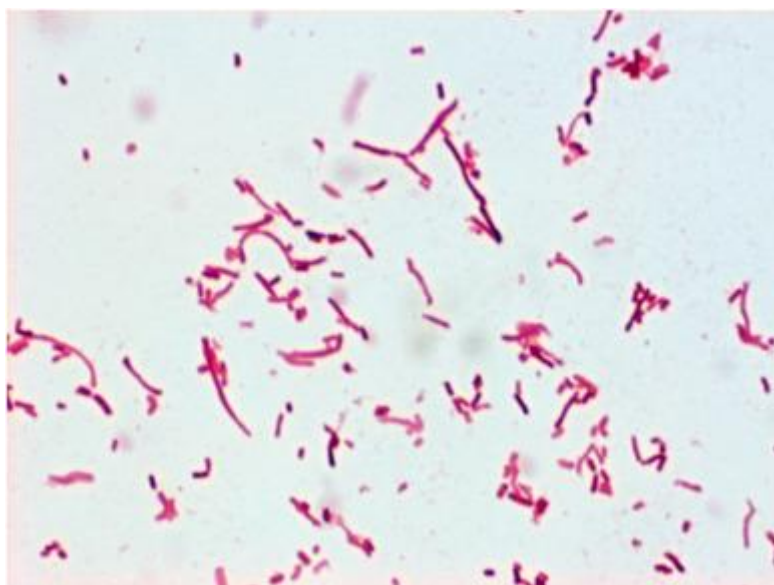
Obrázek č.10 – Anaerobní gram pozitivní koky, barvení dle Grama (1000x)

Dostupné z: https://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcmimg_view?jcm=6508&fid=B

4.5 Rod *Sneathia*

Bakterie rodu *Sneathia* jsou dlouhé, gramnegativní, nepohyblivé tyčinky (viz obrázek č.11). Tyto bakterie byly původně označeny jako rod *Leptotrichia*, ale na základě fenotypových a fylogenetických vlastností byl rod v roce 2012 překlasifikován do rodu *Sneathia*. Tyto organismy jsou kultivačně náročné k růstu a pro růst vyžadují sérum nebo krev. Kolonie vyrůstají na krevním agaru v anaerobním prostředí za 72 hodin. Jsou ploché o průměru 1 mm a obklopené zónou alfa hemolýzy. Do rodu jsou řazeny dva druhy *S. sanguinegens* a *S. amnii*.

Molekulárně biologickými metodami byli zástupci rodu *Sneathia* prokázáni ve vzorcích z genitálního ústrojí žen. Výskyt je spojován se zvýšenou sexuální aktivitou [20].

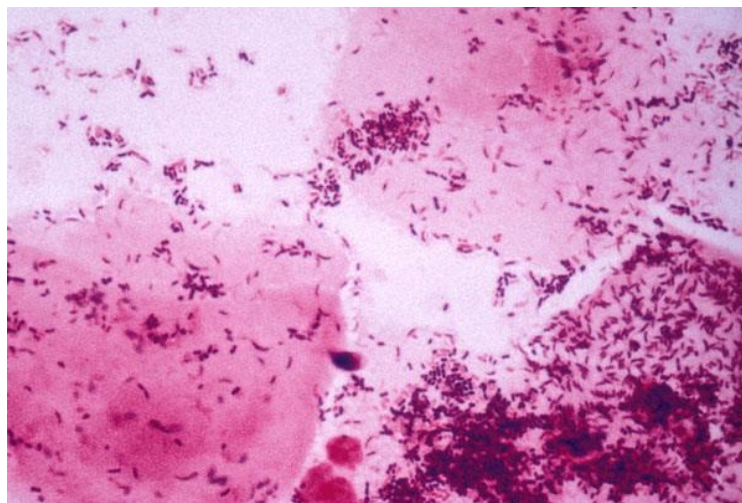


Obrázek č. 11 *Sneathia amnii*, obarveno Gramem (1000x)

Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996420301335>

4.6 Rod *Mobiluncus*

Bakterie rodu *Mobiluncus* jsou pohyblivé, anaerobní, pomalu rostoucí a kultivačně náročné organismy, které pro svůj růst vyžadují obohacené médium obsahující králičí nebo koňské sérum, nebo maltózu či glykogen. Rod obsahuje dva druhy *Mobiluncus curtisii*, který zahrnuje gram labilní nebo gramnegativní dlouhé, přímé nebo mírně zakřivené tyčinky a *Mobiluncus curtisii* subsp. *curtisii* a *Mobiluncus curtisii* subsp. *holmesii* (viz obrázek č.12). Navzdory náročné kultivaci byly bakterie rodu *Mobiluncus* detekovány u 65 %-85 % žen s BV a u 5 % zdravých žen bez příznaku akutního onemocnění [20].



Obrázek č. 12 *Mobiluncus* sp., barveno dle Grama (1000x)

Dostupné z: <https://microbiomology.org/microbe/mobiluncus/>

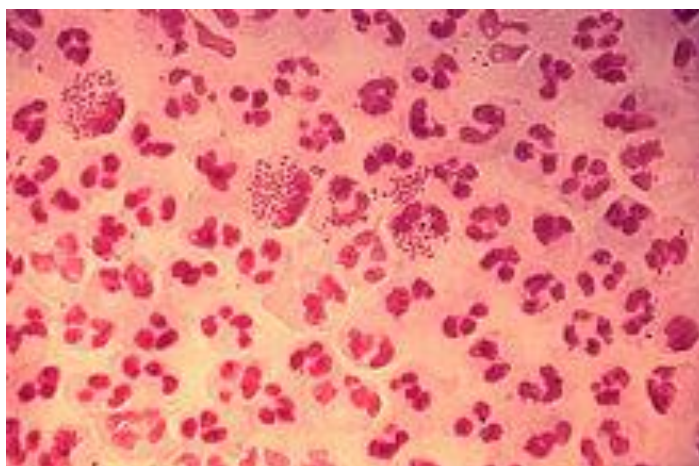
5 PATOGENNÍ MIKROORGANISMY

5.1 *Neisseria gonorrhoeae*

Neisseria gonorrhoeae je původcem onemocnění zvaného kapavka. *N. gonorrhoeae* je gram negativní diplokok tvaru kávového zrna, v každé dvojici jsou koky přivrácené k sobě oploštěnými stranami (viz obrázek č.13). Kultivačně jsou gonokoky velmi náročné. Rostou na obohacených půdách typu ČA, obsahující velmi kvalitní peptony, škrob, pufr. Kultivace probíhá za zvýšeného množství CO₂. Kolonie vypadají jako kapky rosy.

Branou vstupu infekce je sliznice močové trubice a hrdla děložního, na než adherují prostřednictvím fimbrií. Opa-proteiny umožňují vstup gonokoků do epitelů a jejich průnik do submukózy. Z organismu se gonokoky vylučují hnisavým sekretem.

U ženy při kapavce dochází k zanícení hlavně děložního hrdla a většinou také močové trubice, případně mohou být zaníceny i drobné žlázy v okolí poševního vchodu, nikoliv však sliznice [23].



Obrázek č. 13- *Neisseria gonorrhoeae*, barveno dle Grama (1000x)

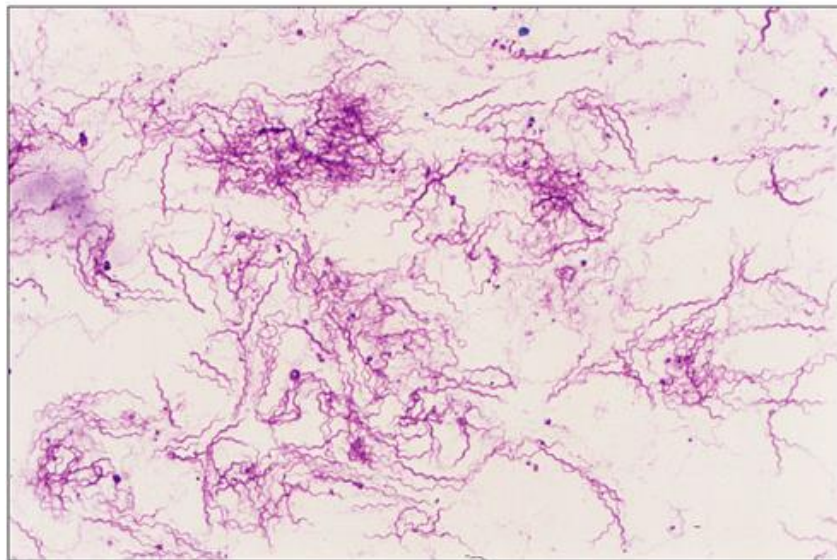
Dostupné z:

https://en.wikipedia.org/wiki/Neisseria_gonorrhoeae#/media/File:Gonococcal_urethritis_PHI_L_4085_lores.jpg

5.2 *Treponema pallidum subsp. pallidum*

Treponema pallidum je pohyblivá pravidelná spirálovitá bakterie (viz obrázek č.14). K pozorování bakteriálních buněk lze využít mikroskopii v zástině. Vyvolává onemocnění zvané syfilis. Dělí se na časnou, do níž patří syfilis primární, sekundární a časná latentní, a pozdní, jež zahrnuje syfilis latentní a terciární.

- Primární syfilis-infekce vstupuje do těla obvykle sliznicí genitálu. Za 3 týdny vzniká v místě vstupu infekce do těla nebolestivý tvrdý vřed, dochází ke zvětšení regionálních mízních uzlin
- Sekundární syfilis-odráží diseminaci treponem do celého organismu, nastupuje cca 2 měsíce po zhojení tvrdého vředu, vzniká vyrážka na kůži a sliznici = condylomata lata (vysoce infekční)
- Latentní syfilis-bezpříznakové období
- Terciární syfilis-asi u třetiny nakažených se po letech, někdy po desítkách let, dostaví příznaky terciární syfilis, mezi ně patří gummata =specifické granulomy v kůži, sliznicích, kostech atd., dále se rozvíjí onemocnění kardiovaskulárního a nervového systému [23]



Obrázek č. 14- *Treponema pallidum*, barveno dle Grama (1000x)

Dostupné z: <https://quizlet.com/49885793/bio-2-lab-exam-flash-cards/>

5.3 Rody *Mykoplasma* a *Ureaplasma*

Mycoplasma a *Ureaplasma* patří do třídy *Mollicutes*. Podle nároků na kyslík je řadíme mezi fakultativně anaerobní mikroorganismy. Protože postrádají buněčnou stěnu, nelze je vizualizovat pomocí Gramova barvení. Druhy *M. hominis* a *M. genitalium*, byly izolovány z genitálního traktu žen. Bylo zjištěno, že *M. genitalium* hraje roli při vyvolávání symptomatické cervicitidy nebo uretritidy, *M. hominis* bylo prokázáno u 24-75 % žen s BV a u 13-22 % žen bez BV.

Ureaplasma urealyticum bylo prokázáno u 78 % žen s normální flórou a u 92 % žen s BV. *U. urealyticum* má řadu faktorů virulence mezi které řadíme hemolyziny, elastázu, IgA proteázu, fosfolipázu C a ureázu, které hrají roli ve vzniku a průběhu BV [20]

5.4 *Chlamydia trachomatis*

C. trachomatis je gramnegativní obligátní intracelulární bakterie. Mezi druhy, které dokáží infikovat člověka patří *C. trachomatis* a *C. pneumoniae*. V současné době existuje 18 identifikovaných sérovarů *C. trachomatis*. Některé sérovary přirozeně infikují oko (sérovar A až C), zatímco jiné infikují primárně genitální tkáň (sérovary D až K). V genitální tkáni *C. trachomatis* infikuje cervikální vrstvu epitelu.

C. trachomatis existuje ve dvou vývojových formách: elementární tělo (EB), které je infekční, nereplikující a extracelulární; a retikulární tělíčko (RB), které je neinfekční, replikující a intracelulární [22].

6 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VAGINÁLNÍ MIKROBIOM

V pochvě se vedle kyseliny mléčné, peroxidu vodíku a bakteriocinů uplatňují i další endogenní a exogenní faktory, které mají vliv na přirozenou mikroflóru, a podtrhují tak komplexní a dynamickou povahu vaginálního ekosystému. Mezi exogenní faktory patří především sexuální aktivita-frekvence, chráněný vs. nechráněný sex, sexuální praktiky. Při nechráněném styku dochází k mikrotraumatizaci sliznice, přechodnému zvýšení pH po ejakulaci a pravděpodobně ke zvýšené aeraci poševního kanálu. K nepříznivým vlivům patří rovněž nadužívání intimní hygieny, časté výplachy pochvy roztoky s nevhodným pH, ale také kouření. Můžeme zde zahrnout i užívání hormonální orální antikoncepce a nepřiměřené užívání antibiotik [17].

Stabilitu vaginální mikrobioty ovlivňuje mnoho faktorů. Složení vaginálních komunit kolísá v závislosti na věku, menarché, menstruaci, těhotenství, infekci, sexuálním chování. Expozice spermicidům a antimikrobiálním látkám může snížit prevalenci laktobacilů a následně zvýšit náchylnost k vaginálním infekcím [24].

Změny ve složení vaginální flóry jsou způsobeny dramatickými hormonálními posuny, ke kterým dochází během života ženy. V raném dětství je vaginální pH neutrální nebo jen mírně zásadité. Vzhledem k tomu, že během puberty stoupají hladiny estrogenu, dochází k většímu hromadění glykogenu ve vaginálních epiteliálních buňkách a to vede ke zvýšenému výskytu bakterií produkující kyselinu mléčnou [24].

Dynamickou rovnováhu vaginálního mikrobiomu lze změnit působením faktoru vnitřního nebo vnějšího prostředí. Jako vnitřní faktory můžeme brát v úvahu změnu hormonálních hladin, menstruaci, menarché, těhotenství. Pokud hovoříme o vnějších faktorech, které ovlivňují složení vaginálního mikrobiomu, jedná se o tyto faktory: sexuální chování, užívání léků např. antibiotik, antikoncepce, nadbytečná intimní hygiena. Působení těchto faktorů může vést k mikrobiální nerovnováze nebo dysbióze v urogenitálním traktu ženy. Působením těchto faktorů, může docházet ke změnám pH což má vliv na pomnožení potencionálně patogenních mikroorganismů, které se při optimální hodnotě pH ve vagíně vyskytují běžně. Jelikož, ale dochází ke zvýšení hodnoty pH, dochází také k pomnožení těchto potencionálně patogenních mikroorganismů a dochází k rozvoji bakteriální vaginózy [24]

7 VYŠETŘENÍ VAGINÁLNÍHO MIKROBIOMU

7.1 Mikrobiální obraz poševní

Stanovení mikrobiálního obrazu poševního představuje završení klasického bakteriologicko-mykologicko-parazitologického vyšetření výtěru z pochvy, jehož úkolem je podílet se na určení příčiny, symptomu poševního výtoku. Příčinou zánětlivého poševního výtoku je infekce způsobená různými mikroorganismy

Mikroskopický obraz poševní (MOP) vyšetření je komplexní vyšetření, které se skládá z nátěru poševního sekretu na mikroskopické vyšetření. V rámci úplnosti se odebírá stěr z cervixu na kultivaci gonokoků, průkaz urogenitálních mykoplazmat a genové sondy na gonokoky a chlamydie.

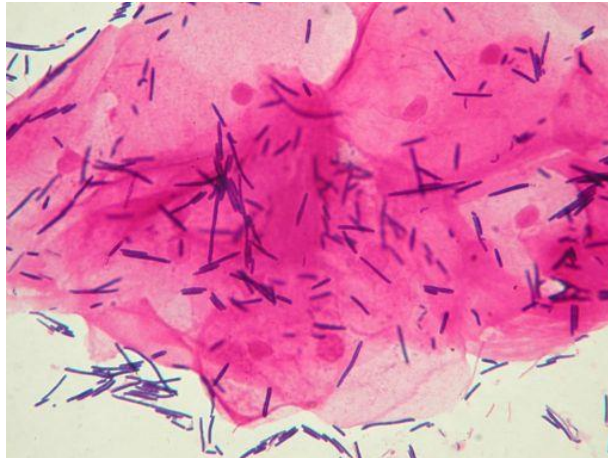
Rozlišujeme šest základních stupňů MOPu, jež odráží šest základních mikrobiologicko-histologických stavů na poševní sliznici ve vztahu k zánětu:

- I. Fyziologický MOP
- II. Bakteriální vaginóza = VB
- III. Bakteriální vaginitida
- IV. Gonorrhoea
- V. Vaginální trichomonóza
- VI. Vaginální mykóza

Při MOPu se hodnotí: epitelie, klíčové buňky, leukocyty, laktobacily, gramnegativní diplokoky, mobiluncus, leptotrichia, anaerobní gramnegativní tyčinky, grampozitivní koky, gramnegativní tyčinky, kvasinkové mikroorganismy a grampozitivní koryneformní tyčinky.

MOP I – Fyziologický

Fyziologický MOP I pro estrogenizovaný terén je charakteristický přebytkem epitelí nad leukocyty a výskytem laktobacilů (viz obrázek č. 15). Vyskytuje se rovněž u novorozenců. Jestliže se mezi laktobacily ojediněle vyskytují grampozitivní koky, tyčinky i gramnegativní tyčinky, označujeme tento MOP jako I-II. Fyziologický MOP 0 pro neestrogenizovaný terén obsahuje pouze parabazální epitelie či holá jádra bez laktobacilů.



Obrázek č. 15 Mikrobiální obraz poševní I (1500x)

Dostupné z: <https://zuova.cz/Home/Page/Mikrobialni-obrazy-posevni>

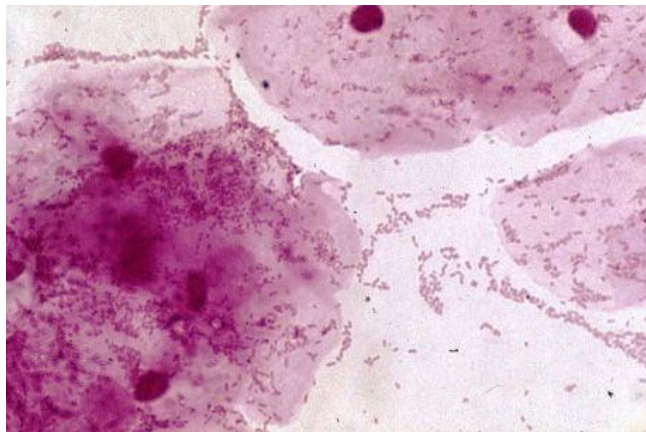
MOP II – Bakteriální vaginóza (VB)

Bakteriální vaginóza je definovaná jako výměna laktobacilů v pochvě za charakteristické skupiny bakterií, což je doprovázeno změnou vlastností poševního sekretu. Hormonální změny vedou k ústupu estrogen-dependentních laktobacilů, proliferace endogenní mikroflóry bakteriální vaginózy, což je propojený ekosystém, jenž tvoří hlavně *Gardnerella vaginalis*, řada anaerobních koků, tyčinek včetně zakřivených tyčinek rodu *Mobiluncus*, mikroaerofilních streptokoků, stafylokoků, korynebakterií, enterokoků, gram negativních fermentujících a nefermentujících tyčinek a urogenitálních mykoplazmat, má za následek tyto změny poševního sekretu:

- Gardnerelly adherují na povrch epitelí, což pozorujeme jako tzv. klíčové buňky, zcela pokryté masou drobných gram negativních tyčinek, tato masa zakrývá okraje buněk. Gardnerely svými produkty mění pH. $\text{pH} > 4,5$ již není fyziologické, touto změnou umožňují pomnožení dalších anaerobů a mykoplazmat.

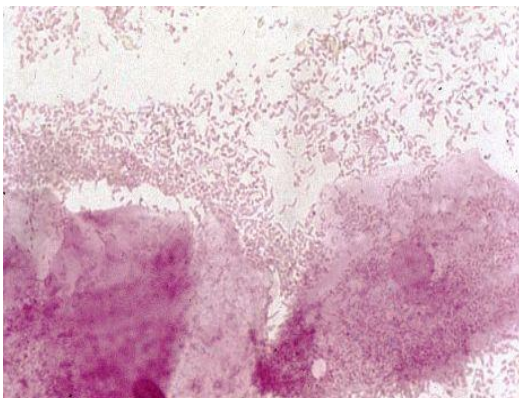
- Anaeroby a mykoplazmata produkují tzv. prchavé abnormální aminy, zvyšující pH sekretu a způsobující jeho typický zápach, jenž můžeme zvýraznit přikápnutím 10% KOH- tzv. aminový či KOH test.
- Zároveň tyto bakterie produkují kyselinu jantarovou, která vede k inhibici migrace polymorfonukleárů. V praxi proto pozorujeme řidší nehnisavý homogenní výtok s převahou epitelů nad leukocyty

MOP II bakteriální vaginózy se dělí dle nepřítomností či přítomností mobilunků na IIa a IIb (viz obrázky č.16,17,18). Poševní sekrety tohoto typu není nutno kultivovat anaerobně.

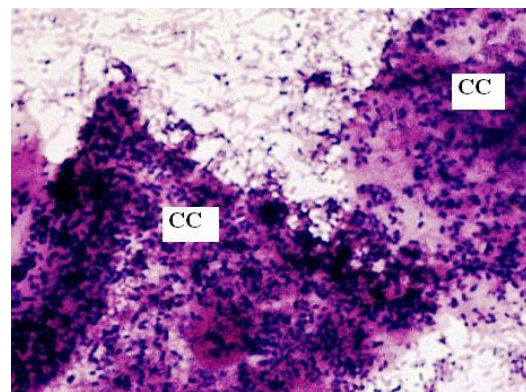


Obrázek č. 16 Mikrobiální obraz poševní IIa (1500x)

Dostupné z: <https://zuova.cz/Home/Page/Mikrobiaalni-obrazy-posevni>



Obrázek č. 17



Obrázek č. 18

Obrázek č. 17 -Mikrobiální obraz poševní IIb (1500x),

Obrázek č. 18- Mikrobiální obraz poševní IIb (3000x)

Dostupné z: <https://zuova.cz/Home/Page/Mikrobiaalni-obrazy-posevni>

MOP III-Zánětlivá bakteriální vaginitida

MOP III je obecně charakterizován přebytkem leukocytů a nepřítomností laktobacilů. Dělí se do čtyř podskupin.

- IIIa aerobní infekce mimo β -hemolytické streptokoky
- IIIb β -hemolytické streptokoky
- IIIc anaerobní tyčky mimo leptotrichie
- IIId *Leptotrichia buccalis*.

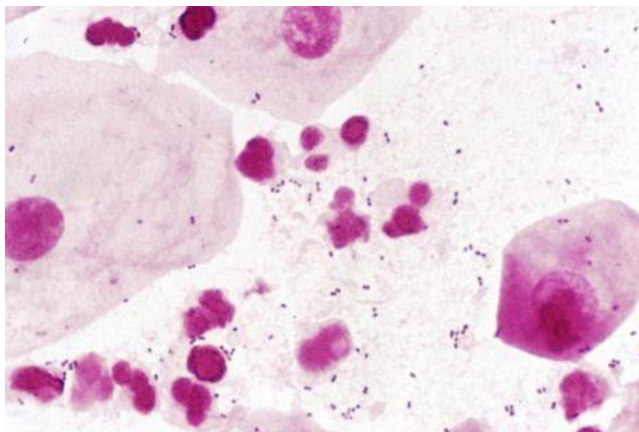
U MOPu III je nezbytná anaerobní kultivace, neboť k spolehlivému určení bakterie a stanovení citlivosti k antibakteriálním preparátům nestačí mikroskopie, nýbrž čistá kultura testovaného kmene.

U IIIa nacházíme obvykle řadu oportunně patogenních aerobních a fakultativně anaerobních bakterií. Izolujeme gramnegativní tyčinky čeledi *Enterobacteriaceae*- nejčastěji kmeny *E.coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Proteus sp.*, *Morganella morganii* a řadu dalších včetně salmonel a shigel. Dále pseudomonády, acinetobaktery, moraxely a řadu dalších nefermentujících tyčinek, z grampozitivních koků hlavně enterokoky a *S. aureus*.

U IIIb je charakteristický kultivační průkaz β -hemolytických streptokoků, a to buď v čisté kultuře nebo ve směsi s aerobními či mikroaerofilními bakteriemi (viz obrázek č.19).

U IIIc izolujeme anaerobní tyčinky čeledi *Bacteroidaceae* s výjimkou leptotrichií. Zde je nezbytná dobrá diagnostika a stanovení citlivosti k antibiotikům.

U IIId je charakteristická mikroskopie a kultivační průkaz protáhlé anaerobní gramnegativní tyčinky *Leptotrichia buccalis*.

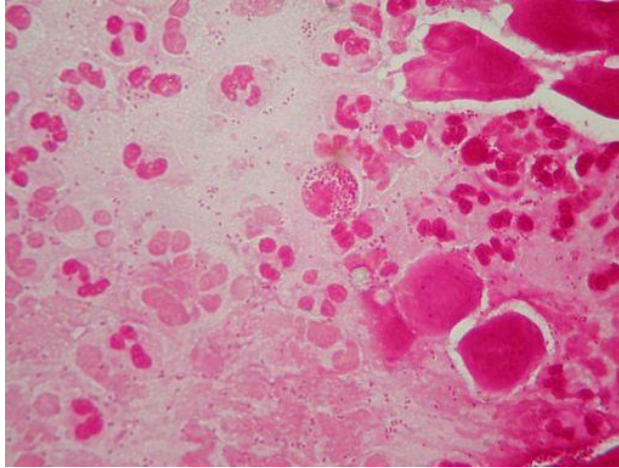


Obrázek č. 19 – Mikrobiální obraz poševní IIIb (1500x)

Dostupné z: <https://zuova.cz/Home/Page/Mikrobiální-obrazy-posevni>

MOP IV-Kapavka

MOP IV diagnostikujeme pouze v případě pozitivní kultivace. Výskyt gonokoků v poševním sekretu však může být i u pozitivní kapavky negativní. Při tomto MOPu je vždy nutné vyšetřit i endocervix. Zmnožení gonoků s přítomnou leukocytózou (viz obrázek č.20).



Obrázek č. 20- Mikrobiální obraz poševní IV (1500x)

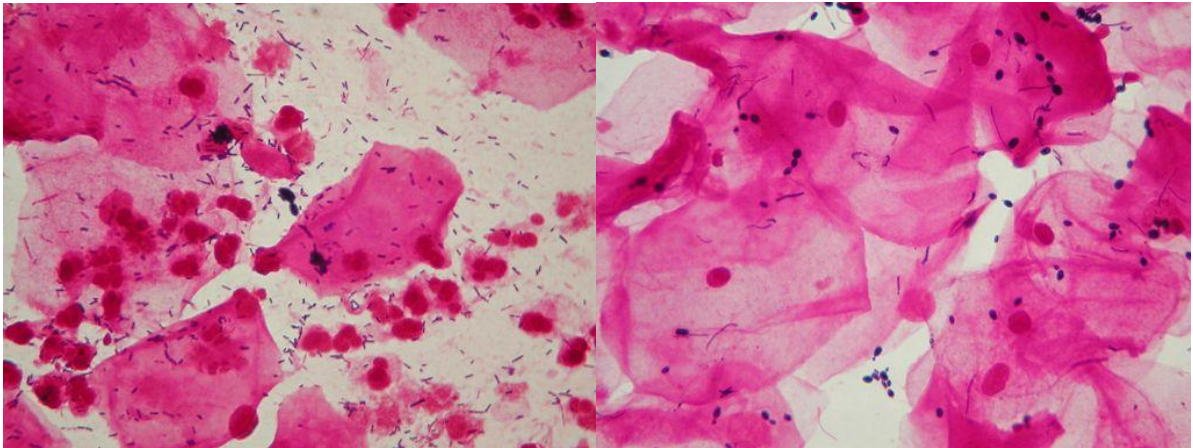
Dostupné z: <https://zuova.cz/Home/Page/Mikrobiani-obrazy-posevni>

MOP V-Vaginální trichomonózy

Diagnostika u MOPu V vyžaduje samostatný odběr do zvláštní transportní a kultivační soupravy. Prvok po pomnožení se pak diagnostikuje mikroskopicky v nativním preparátu. Nelze jej prokázat při barvení Gramem u běžného MOPu a při klasické bakteriální kultivaci.

MOP VI-Vaginální mykóza

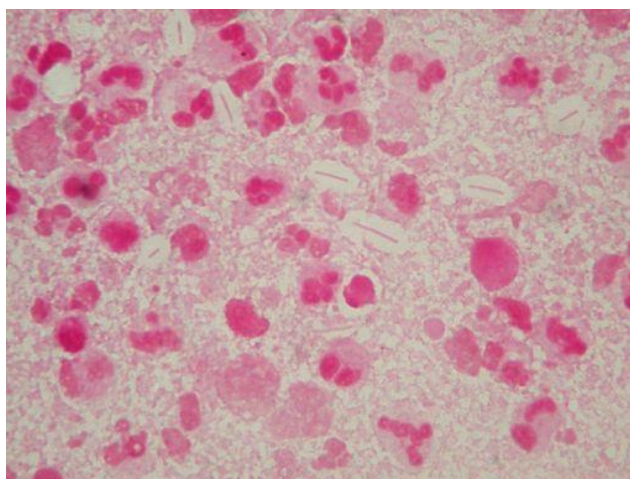
MOP VI se prokazuje mikroskopickým nálezem blastospor či pseudohyf kvasinkovitých mikroorganismů a jejich kultivačním průkazem (viz obrázek č.21). Tato estrogen-dependentní flóra je často doprovázena laktobacily nebo směsí koků a tyčinek, často β -hemolytických streptokoků. Dle poměru epitelů a leukocytů dělíme tento obraz na VIa-suchá nehnisavá mykóza a VIb-hnisavá mykóza [15].



Obrázek č. 21- Mikrobiální obraz poševní VIa (1500x)

Dostupné z: <https://zuova.cz/Home/Page/Mikrobiani-obrazy-posevni>

Při MOPu 0-III se mohou v mikroskopickém nálezů objevovat *E.coli* (viz obrázek č.22)



Obrázek č. 22-Mikrobiální obraz 0-III (1500x), kultivačně *E.coli* v M-fázi

Dostupné z: <https://zuova.cz/Home/Page/Mikrobiani-obrazy-posevni>

7.2 Sekvenování

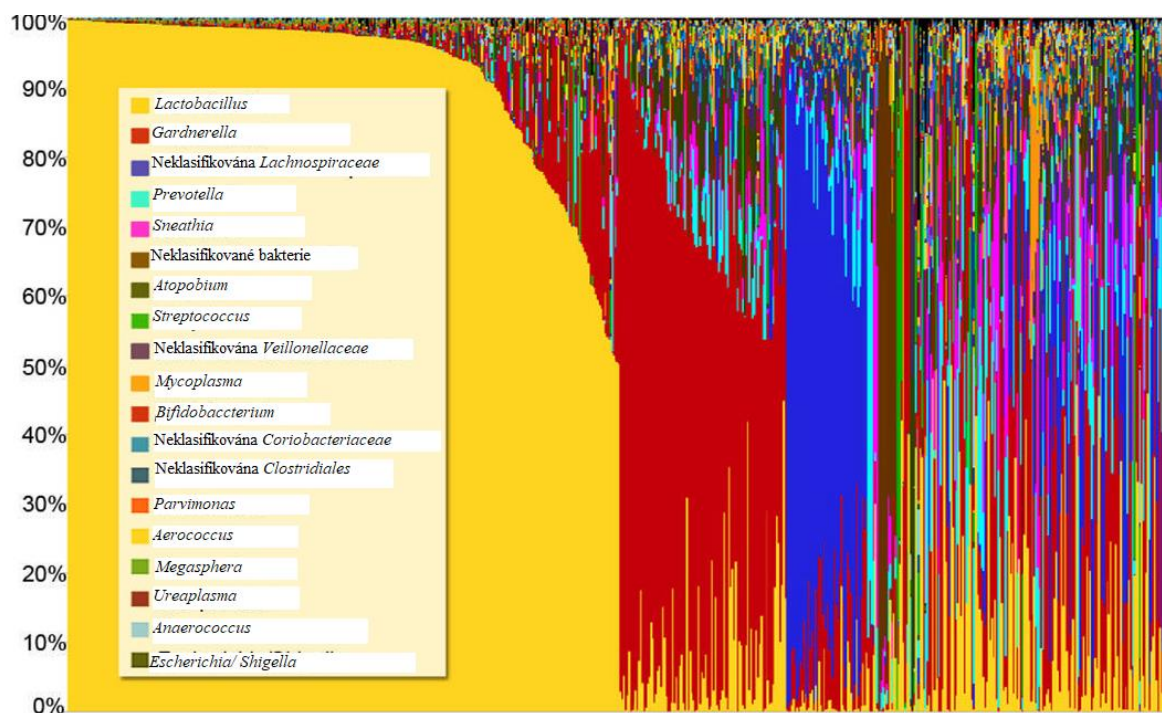
Analýzy na úrovni druhů a kmenu jsou důležité pro pochopení vaginálního ekosystému. Patří mezi ně následující aplikace pro sekvenování nové generace:

1. Metagenomické průzkumy taxonomických markerů s jedním genem, jako je gen 16S rRNA
2. Multigenomové a celogenomové analýzy sledovaných bakteriálních genomů
3. Průzkumy celých metagenomických části vaginálních vzorků

V 16S rDNA metagenomických studiích, které umožňují identifikaci a relativní kvantifikaci bakteriálních taxonů, je obvykle sekvenována pouze část 16S rRNA genu a to z důvodu omezení délky čtení sekvenčních technologií nové generace. Ovšem ne všechny druhy lze touto metodou rozlišit. Tato analýza je vhodná pro rozlišení jednoduchých vaginálních druhů rodu *Lactobacillus* a dalších mikroorganismů, které se podílejí na tvorbě vaginálního mikrobiomu (viz obrázek č.23).

V rámci projektu Vaginal Human Microbiome Project se začali zaměřovat na gen chaperoninu-60 jako alternativu ke genu 16S rRNA pro identifikaci mikrobů ve vaginálních vzorcích. Profily vaginálního mikrobiomu analyzované prostřednictvím genu chaperonin-60 umožnily rozlišení na úrovni druhů. [25].

Taxonomická klasifikace na úrovni rodu obsahuje celkem 650 profilů mikrobiomu (viz obrázek č.24). Každý sloupec představuje profil mikrobiomu na úrovni rodu pro jeden vaginální vzorek, každá barva představuje jiný bakteriální rod [25].



Obrázek č. 23- Profily mikrobiomu

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3517151/>

8 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo detailnější seznámení se s problematikou vaginálního mikrobiomu. Bakteriální vaginóza je poměrně častým důvodem, pro které ženy vlivem dyskomfortu s nimi spojených nejprve navštíví lékárnou za účelem pořízení patřičných léčivých přípravků, a pakliže potíže s jejich aplikací neustoupí, vyhledají pomoc odborného lékaře-gynekologa. Vzhledem k množství faktorů, které mohou bakteriální vaginózu zapříčinit, bývá gynekologem indikováno bakteriologicko-mykologicko-parazitologické vyšetření výtěru z pochvy za účelem určení příčiny poševního výtoku. Na základě jeho výsledku pak gynekolog doporučí příslušnou medikaci, v některých případech i antibiotika eliminující příčinu poševního zánětu.

Na základě vědeckých poznatku o složení vaginálního mikrobiomu, se lze domnívat, že některé ze spouštěčů bakteriální vaginózy, zejména tedy vnější faktory lze alespoň částečně eliminovat. Přínosem práce je získání povědomí o nezanedbatelném vlivu vlastního přístupu každé ženy, determinujícího četnost výskytu bakteriálních vaginóz. Léčbu sice lze s ohledem na úroveň lékařské vědy spolehlivě zacílit, nicméně už samotný rozvoj onemocnění je zátěží pro organismus, jíž lze alespoň částečně předcházet.

9 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] PILKA, Radovan. *Gynekologie*. Praha: Maxdorf, [2017]. Jessenius. ISBN 978-80-7345-530-9. str. 11 (citováno 5.4.2021)
- [2] PILKA, Radovan. *Gynekologie*. Praha: Maxdorf, [2017]. Jessenius. ISBN 978-80-7345-530-9. str. 16 (citováno 5.4.2021)
- [3] CITTERBART, Karel. *Gynekologie*. Praha: Galén, c2001. ISBN 80-726-2094-0. str.5 (citováno 5.4.2021)
- [4] CITTERBART, Karel. *Gynekologie*. Praha: Galén, c2001. ISBN 80-726-2094-0. str.6 (citováno 5.4.2021)
- [5] [6] [7] ROKYTA, Richard. *Fyziologie*. Třetí, přepracované vydání (první vydání v nakladatelství Galén). Praha: Galén, [2016]. ISBN ISBN978-80-7492-238-1.
- [8] CECCARANI, Camilla, Claudio FOSCHI, Carola PAROLIN, et al. Diversity of vaginal microbiome and metabolome during genital infections: Rethinking Health and Disease. *Scientific Reports*. 2019, **9**(1), 371-389. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-50410-x
- [9] [12] MA, Bing, Larry J. FORNEY a Jacques RAVEL. Vaginal Microbiome: Rethinking Health and Disease. *Annual Review of Microbiology*. 2012, **66**(1), 371-389. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-micro-092611-150157
- [10] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902-8966-5. (citováno 19.4.2021)
- [11] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie- vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, c2010. ISBN ISBN978-80-86850-04-8. (citováno 19.4.2021)
- [13] TACHEDJIAN, Gilda, Muriel ALDUNATE, Catronia S. BRADSHAW a Richard A. CONE. The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. *Research in Microbiology* [online]. 2017, **168**(9-10), 782-792 [cit. 2021-4-25]. ISSN 09232508. Dostupné z: doi:10.1016/j.resmic.2017.04.001 (citováno dne 25.4. 2021)

- [14] ANDERSON, Deborah J., Jai MARATHE a Jeffrey PUDNEY. The Structure of the Human Vaginal Stratum Corneum and its Role in Immune Defense. *American Journal of Reproductive Immunology* [online]. 2014, **71**(6), 618-623 [cit. 2021-4-27]. ISSN 10467408. Dostupné z: doi:10.1111/aji.12230
- [15] HOLEC, Vladislav. *Mikrobiální obrazy poševní – diagnostika, interpretace a trochu historie* [online]. [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: <https://zuova.cz/Home/Page/Mikrobialni-obrazy-posevni>
- [16] Gilda Tachedjian, Muriel Aldunate, Catronia S. Bradshaw, Richard A. Cone, The role of lactic acid production by probiotic Lactobacillus species in vaginal health, *Research in Microbiology*, Volume 168, Issues 9–10, 2017, Pages 782-792, ISSN 0923-2508, <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.04.001>.
- [17] Doc. RNDr. Vladimír Buchta. Vaginální mikrobiom: Vaginal microbiome. *Česká gynekologie*. 2018, 371-379.
- [18] DOBSON, Alleson, Paul D. COTTER, R. Paul ROSS a Colin HILL. Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2011, **78**(1), 1-6 [cit. 2021-6-7]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.05576-11
- [19] HUANG, Bernice, Jennifer M. FETTWEIS, J. Paul BROOKS, Kimberly K. JEFFERSON a Gregory A. BUCK. The Changing Landscape of the Vaginal Microbiome. *Clinics in Laboratory Medicine* [online]. 2014, **34**(4), 747-761 [cit. 2021-6-7]. ISSN 02722712. Dostupné z: doi:10.1016/j.cll.2014.08.006
- [20] ONDERDONK, Andrew B., Mary L. DELANEY a Raina N. FICHOROVA. The Human Microbiome during Bacterial Vaginosis. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2016, **29**(2), 223-238 [cit. 2021-6-8]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00075-15
- [21] FETTWEIS, Jennifer M., Myrna G. SERRANO, Philippe H. GIRERD, Kimberly K. JEFFERSON a Gregory A. BUCK. *A New Era of the Vaginal Microbiome: Advances Using Next-Generation Sequencing* [online]. 2012, **9**(5), 965-976 [cit. 2021-6-8]. ISSN 16121872. Dostupné z: doi:10.1002/cbdv.201100359
- [22] VASILEVSKY, S., G. GREUB, D. NARDELLI-HAEFLIGER a D. BAUD. Genital Chlamydia trachomatis: Understanding the Roles of Innate and Adaptive Immunity in Vaccine

Research. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2014, **27**(2), 346-370 [cit. 2021-6-8]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00105-13

[23] VOTAVA, Miroslav. *Klinická mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2014. ISBN 978-80-210-7503-0.

[24] HUANG, Bernice, Jennifer M. FETTWEIS, J. Paul BROOKS, Kimberly K. JEFFERSON a Gregory A. BUCK. The Changing Landscape of the Vaginal Microbiome. *Clinics in Laboratory Medicine* [online]. 2014, **34**(4), 747-761 [cit. 2021-6-9]. ISSN 02722712. Dostupné z: doi:10.1016/j.cll.2014.08.006

[25] FETTWEIS, Jennifer M., Myrna G. SERRANO, Philippe H. GIRERD, Kimberly K. JEFFERSON a Gregory A. BUCK. *A New Era of the Vaginal Microbiome: Advances Using Next-Generation Sequencing* [online]. 2012, **9**(5), 965-976 [cit. 2021-6-9]. ISSN 16121872. Dostupné z: doi:10.1002/cbdv.201100359