UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2022 **Bc. ELIŠKA KETNEROVÁ**

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Mikroflóra poševní sliznice žen podstupujících asistovanou reprodukci

Diplomová práce

2022 **Bc. Eliška Ketnerová**

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Bc. Eliška Ketnerová**
Osobní číslo:	**C20475**
Studijní program:	**N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce:	**Mikroflóra poševní sliznice žen podstupujících asistovanou reprodukci**
Téma práce anglicky:	**The Vaginal Microbiota Composition Of Women Undergoing Assisted Reproduction**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Vypracovat literární rešerši na téma vaginální mikrobiom.
2. Zaměřit se na zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů v genitálním ústrojí neplodných žen.

Experimentální část:

1. Vyšetřit vzorky stěrů z genitálního ústrojí žen navštěvujících Centrum asistované reprodukce SANUS.
2. Vyhodnotit získané výsledky a porovnat s publikovanými údaji.
3. Diplomovou práci zpracovat v souladu se směrnicí č. 7/2019 univerzity Pardubice 'Pravidla pro odevzdání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací.

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

Seznam doporučené literatury:

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

Konzultant diplomové práce: **RNDr. Radek Hampl, Ph.D.**
Centrum asistované reprodukce Pardubice

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

prof. Mgr. Roman Kanďár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Mikroflóra poševní sliznice žen podstupujících asistovanou reprodukci 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 5.5.2022 Eliška Ketnerová v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat své vedoucí diplomové práce RNDr. Markétě Vydržalové, Ph. D., za odborné vedení, ochotu, cenné rady a strávený čas při zpracování této práce. Mé poděkování patří též RNDr. Radku Hamplovi, Ph.D., z Centra asistované reprodukce Sanus za poskytnutí vzorků a Mgr. Ivaně Kusé z laboratoře MEDILA za pomoc při identifikaci mikroorganismů.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá identifikací jednotlivých druhů mikroorganismů genitálního ústrojí žen, které podstupují intrauterinní inseminaci. Vzorky byly vyhodnocovány na základě růstu na kultivačních půdách, antigenních a biochemických vlastností a morfologie bakteriálních buněk po obarvení preparátu dle Grama. Diagnostika mikroorganismů byla provedena metodou MALDI TOF MS. Detekce druhů *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* byla potvrzena metodou PCR.

KLÍČOVÁ SLOVA

vaginální mikroflóra, intrauterinní inseminace, poševní sliznice, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, laktobacily, MALDI TOF MS, PCR

TITLE

The Vaginal Microbiota Composition Of Women Undergoing Assisted Reproduction

ANNOTATION

The thesis deals with the identification of individual species of microorganisms of the genital tract of women undergoing intrauterine insemination. The samples were evaluated on the basis of growth on culture media, antigenic and biochemical properties and morphology of bacterial cells after Gram staining of the slides. Diagnosis of microorganisms was performed by MALDI TOF MS method. Detection of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* species was confirmed by PCR.

KEYWORDS

vaginal microflora, intrauterine insemination, vaginal mucosa, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, lactobacilli, MALDI TOF MS, PCR

OBSAH

ÚVOD 14

1 TEORETICKÁ ČÁST 15

1.1 Vaginální eubióza vs vaginální dysbióza 15

1.1.1 Jedinečné typy stavu mikrobiální komunity 16

1.1.2 Bakteriální vaginóza 17

1.1.3 Vulvovaginální kandidóza 19

1.1.4 Aerobní vaginitida 19

1.2 Vaginální mikroflóra zdravých žen 20

1.3 Rod *Lactobacillus* 22

1.4 Kvasinky 23

1.5 Rod *Gardnerella* 25

1.6 Rod *Ureaplasma* 26

1.7 Rod *Mycoplasma* 26

1.8 Rod *Corynebacterium* 27

1.9 Rod *Cutinebacterium* 28

1.10 Rod *Actinomyces* 29

1.11 Rod *Staphylococcus* 29

1.12 Rod *Streptococcus* 31

1.13 Rod *Enterococcus* 32

1.14 Rod *Escherichia* 33

1.15 Neplodnost žen 34

1.15.1 Vaginální flóra neplodných žen 34

1.15.2 Spojitost mikroorganismů s neplodností žen 35
1.15.3 Spojitost mikroorganismů s neplodností mužů 36
2 CÍL PRÁCE 37
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 38
3.1 Vyšetřovaný materiál 38
3.2 Sbírkové kmeny 38
3.3 Přístroje, pomůcky a chemikálie 38
3.4 Složky pro přípravu kultivačních médií a transportního média 39
3.5 Příprava kultivačních médií 41
3.6 Chemikálie a reagencie pro PCR a elektroforézu 44
3.7 Pracovní postupy 45
3.8 MALDI TOF MS 47
3.9 Izolace a detekce DNA u *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* 48
3.9.1 Postup při izolaci DNA 48
3.9.2 Druhově specifická PCR pro detekci *M. hominis* a *U. urealyticum* 48
3.9.3 Detekce amplifikovaného produktu 49
4 VÝSLEDKY A DISKUZE 51
5 ZÁVĚR 61
6 LITERÁRNÍ ZDROJE 63
7 PŘÍLOHY 72

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1- Hlavní faktory, které podmiňují eubiózu a dysbiózu u UGT (horní genitální trakt) a LGT (dolní genitální trakt) (Punzón-Jiménez a Labarta, 2021) 16

Obrázek 2- Normální vaginální flóra vs. bakteriální vaginóza (Saraf a kol., 2021).....18

Obrázek 3- Molekulový marker 155-970 (Top-Bio) 45

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1- Primery použité pro detekci *Mycoplasma hominis* 49

Tabulka 2- Primery použité k detekci *Ureaplasma urealyticum* 49

Tabulka 3- Složení reakční směsi pro PCR detekci *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealy*ticum 49

Tabulka 4- Seznam indikací pro intrauterinní inseminaci 56

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1- Průměrné zastoupení rodů ve vzorcích s aerobní vaginitidou, normální vaginální mikroflórou a bakteriální vaginózou. *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp. a *Gardnerella* spp. byly převládajícími rody u aerobní vaginitidy, normální vaginální mikroflóry a bakteriální vaginózy. Streptokok byl významně hojnější aerobní vaginitidy než u bakteriální vaginózy a normální vaginální mikroflóry (Tao a kol., 2019) 20

Graf 2- Charakterizace rodu *Lactobacillu*s na úrovni druhů. Zastoupení laktobacilů je znázorněno v rámci čtyř skupin. (a) zdravé ženy, (b) C. trachomatis, (c) vulvovaginální kandidóza a (d) bakteriální vaginóza (Ceccarani a kol., 2019) 23

Graf 3- Zastoupení jednotlivých druhů mikroorganismů ve vaginální mikroflóře žen podstupujících intrauterinní inseminaci 51

Graf 4- Výskyt mikroorganismů u žen s neúspěšnou intrauterinní inseminací 53

Graf 5- Výskyt mikroorganismů u žen s úspěšnou intrauterinní inseminací 53

Graf 6- Výskyt mikrobiálních druhů se vztahem k neplodnosti v závislosti na věku ženy 55

Graf 7- Výskyt mikrobiálních druhů v závislosti na věku ženy 55

Graf 8- Výskyt mikrobiálních druhů se vztahem k neplodnosti v závislosti na diagnóze 57

Graf 9- Výskyt mikrobiálních druhů v závislosti na diagnóze 57

Graf 10- Výskyt mikroorganismů ve vzorcích u dvakrát vyšetřených žen 58

Graf 11- Výskyt mikrobiálních druhů se vztahem k neplodnosti v závislosti na mikrobiálním poševním obrazu 60

Graf 12- Výskyt mikrobiálních druhů v závislosti na mikrobiálním poševním obrazu 60

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AV	aerobní vaginitida
BV	bakteriální vaginóza
CoNS	koaguláza negativní stafylokoky
CST	jedinečné typy stavu mikrobiální komunity
GBS	streptokoky skupiny B
HIV	lidský virus imunitní nedostatečnosti
IUI	intrauterinní inseminace
LAB	bakterie mléčného kvašení
LGT	dolní genitální trakt
PCR	polymerázová řetězová reakce
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
RVVC	rekurentní vulvovaginální kandidóza
STI	sexuálně přenosné infekce
UGT	horní genitální trakt
UPEC	uropatogenní *Escherichia coli*
UTI	infekce močových cest
VMB	vaginální mikroflóra
VVC	vulvovaginální kandidóza
MALDI TOF MS	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátorem
MOP	mikrobiální poševní obraz
kol.	kolektiv
PPLO	pleuoropneumonii podobné organismy

ÚVOD

Mikrobiota ve vaginální mikroflóře hraje klíčovou roli pro udržení vaginální eubiózy. Pokud je rovnováha ve vaginální mikroflóře narušena dojde k tzv. dysbióze. Tento stav vede k patologickým poruchám ve vaginálním prostředí. Komenzální mikroorganismy tak mohou přejít v patogenní a způsobovat onemocnění, které může mít vliv na plodnost ženy. V této práci je popsán vztah mikroorganismů k plodnosti žen.

Důležitou úlohu ve vaginální mikroflóře mají mikroorganismy, mezi které patří druhy rodů *Lactobacillus* spp. a *Gardnerella vaginalis*. Mikroorganismy, které mohou být součástí fyziologické vaginální mikroflóry jsou *Candida* spp., *Staphylocuccus* spp., *Streptococcus* spp. nebo *Corynebacterium* spp.

Práce popisuje tuto problematiku počínaje vaginální mikroflórou žen, přes popis patogenních infekcí, včetně podrobnějších popisů jednotlivých druhů mikroorganismů a vaginální mikroflóry neplodných žen.

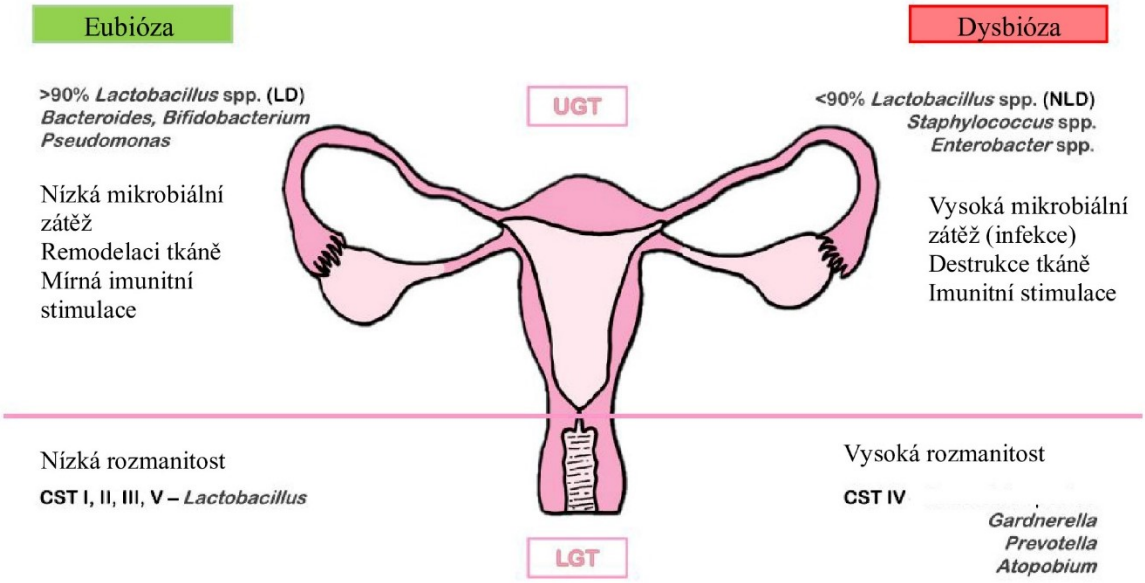
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Vaginální eubióza vs vaginální dysbióza

Mikrobiota hraje zásadní roli ve fyziologických mechanismech člověka, jako je imunita a výživa. Vytvářejí vzájemně prospěšný vztah s lidským hostitelem, kde hostitel poskytuje úkryt a výživu, a na oplátku chrání hostitele před řadou patogenních mikroorganismů (Saraf a kol., 2021). Ostrý kooperativní vztah mikrobů s hostitelem poskytuje ve vagině první linii obrany proti migraci oportunních patogenů (Kalia a kol., 2020). Mikrobiota působí jako přední obránce proti invazi mikroorganismů fenoménem nazývaným „kolonizační rezistence“, tj. brání cizím organismům kolonizovat místa lidského těla a následně způsobit infekci. Struktura mikrobiálních společenstev v mikrobiotě je zásadní pro zdravotní stav jedince (Saraf a kol., 2021). Tato zdravá rovnováha se nazývá eubióza (Kalia a kol., 2020). Jedná se o zdravý a vyvážený mikrobiální ekosystém (Punzón-Jiménez a Labarta, 2021).

Rovnováha vaginálního mikrobiomu může být změněna faktory prostředí a vnějšími interferencemi. Tyto změny mohou vést k mikrobiální nerovnováze nebo dysbióze v urogenitálním traktu. Normálně komenzální bakteriální komunity přítomné ve vagině se mohou za určitých okolností stát patogenními (např. *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli* a *Candida albicans*), pokud posun v rovnováze podporuje jejich konkurenceschopnost. Změny ve vaginálním mikrobiomu tedy mohou vést k intervalům zvýšené citlivosti, které negativně ovlivňují schopnost komunity odolávat kolonizaci patogeny (Huang a kol., 2014). Převaha oportunních patogenů narušuje tuto symbiotickou rovnováhu označovanou jako dysbióza, která dále vede k zánětu (Kalia a kol., 2020). Mikrobiální dysbióza zhoršuje zdravotní stav tím, že zvyšuje náchylnost hostitele ke spektru zánětlivých a metabolických poruch, jako je obezita a syndrom dráždivého tračníku. Dysbióza ve vaginální mikrobiotě může být fyziologická nebo patologická v závislosti na souhře metabolických a mikrobiálních faktorů. Vaginální mikrobiota se vyvíjí s věkem, přičemž anaerobní mikroby jsou dominantní v předpubertálním věku až po vaginu bohatou na *Lactobacillus* v reprodukčním věku. Hormonální vliv je také důležitým faktorem, který určuje různé fáze ženského reprodukčního cyklu. Mezi hormony je známo, že estrogen vytváří výrazné změny ve vaginální mikrobiotě. Fyziologické (těhotenství a menstruační cyklus) a patologické změny jsou spojeny s významnými změnami vaginální mikrobioty (Saraf a kol., 2021).

Narušení vaginálního ekosystému však přispívá k přemnožení patogenů, které způsobují komplikované vaginální infekce, jako je bakteriální vaginóza (BV), sexuálně přenosné infekce (STI) a vulvovaginální kandidóza (VVC) (Chee a kol., 2020). BV, VVC a aerobní vaginitida (AV) jsou onemocnění genitálního ústrojí, která vážně ovlivňují ženské reprodukční zdraví. Jsou spojovány s neplodností, mimoděložním těhotenstvím a pohlavně přenosnými chorobami (He a kol., 2020).



Obrázek 1- Hlavní faktory, které podmiňují eubiózu a dysbiózu u UGT (horní genitální trakt) a LGT (dolní genitální trakt) (Punzón-Jiménez a Labarta, 2021)

1.1.1 Jedinečné typy stavu mikrobiální komunity

Na základě četnosti a složení vaginálních bakteriálních druhů u žen v reprodukčním věku byly jedinečné typy stavu mikrobiální komunity (CST) klasifikovány do pěti hlavních typů. CST-I, CST-II, CST-III a CST-V jsou charakterizovány množstvím *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* a *L. jensenii*, v daném pořadí.

CST-IV se však vyznačuje směsí různých fakultativních anaerobů s nízkými hladinami laktobacilů. Je dále rozdělen do dvou dílčích stavů CST IV-A a CST IV-B.

CST IV-A obsahuje druhy rodů *Anaerococus* spp., *Peptoniphilus* spp., *Corynebacterium* spp., *Prevotella* spp., *Finegoldia* spp. a *Streptococcus* spp..

CST IV-B je charakterizován rody *Atopobium*, *Gardnerella*, *Sneathia*, *Mobiluncus*, *Megasphera* a dalšími taxony řádu *Clostridiales*.

Na základě Nugentova skóre představuje CST-IV nejběžnější stav dysbiózy, tj. bakteriální vaginózu. Je stále diskutabilní, zda tento CST představuje zdravý stav nebo asymptomatický stav bakteriální vaginózy (Kalia a kol., 2020).

1.1.2 Bakteriální vaginóza

Jedná se o polymikrobiální nerovnováhu a celosvětově nejběžnější vaginální nerovnováha u žen v reprodukčním věku, která postihuje 20–25 % obecné populace a až 50 % žen navštěvujících gynekologii (Huang a kol., 2014). Bakteriální vaginóza je doprovázena posunem vaginální mikrobioty s následnou ztrátou ochranných druhů *Lactobacillus* a současným zvýšením množství fakultativních a anaerobních mikroorganismů ve vaginálním mikroprostředí. Narušení normální ekologické rovnováhy vede k nadměrnému růstu několika druhů anaerobů a mikroaerofilů, mezi které patří *Gardneralla (G.) vaginalis, Mycoplasma hominis, Mobiluncus* spp*., Bacteroides* spp*., Prevotela* spp*., Peptostreptococcus* spp*., Fusobacterium* spp*. a Porphyromonas* spp. (Saraf a kol., 2021). Tento stav je srovnatelný s konfigurací

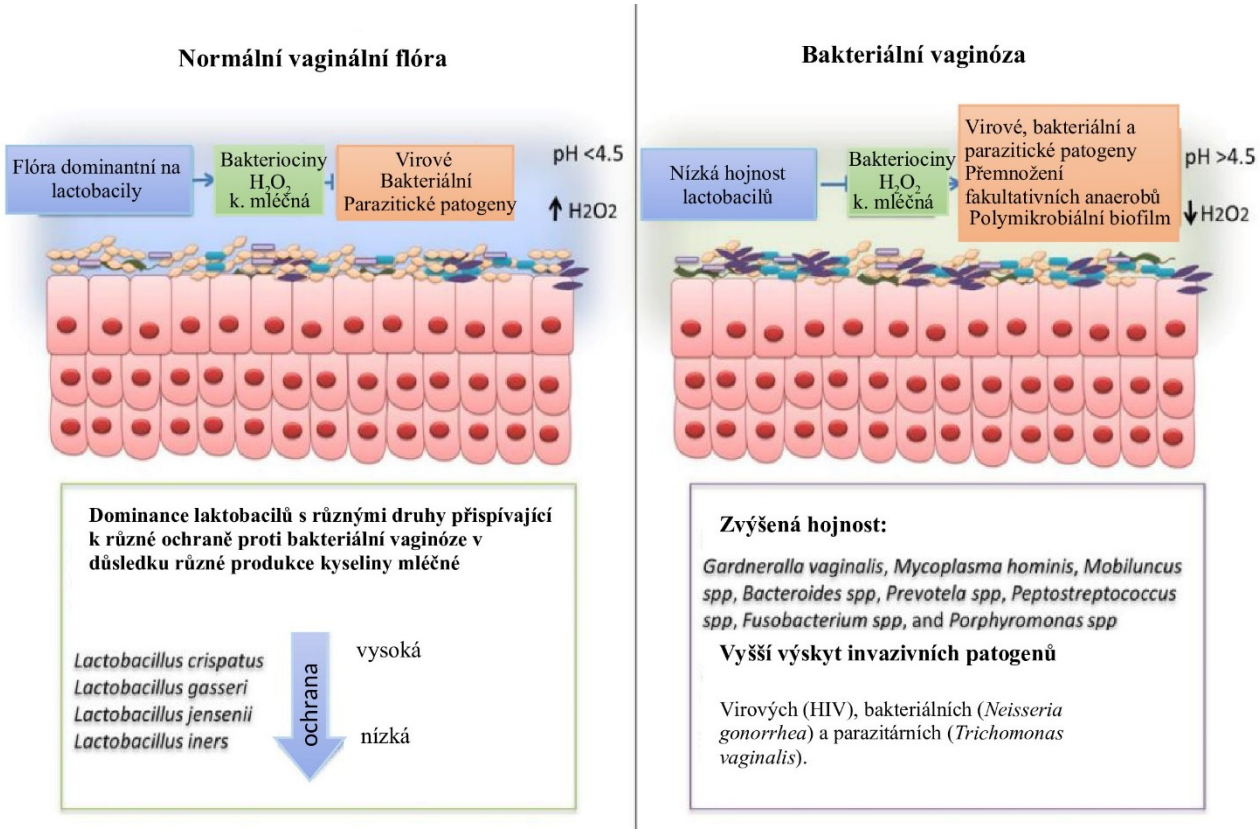
CST-IV (Punzón-Jiménez a Labarta, 2021). I když je BV považována za polymikrobiální onemocnění, *G. vaginalis* významně přispívá k rozvoji tohoto onemocnění a je přítomna v 95 % případů (Huang a kol., 2014). Ztráta laktobacilů narušuje přirozený ochranný mechanismus a vede k vyššímu než normálnímu pH (>4,5) v důsledku vyčerpání kyseliny mléčné. Klinicky se onemocnění projevuje jako páchnoucí vaginální výtok, pocit pálení při močení a svědění kolem pochvy i mimo ni.

Existuje mnoho rizikových faktorů spojených s BV např. vaginální výplach, střídání sexuálních partnerů, kouření, používání nitroděložního tělíska, používání vonných mýdel a anamnéza vaginální infekce. BV je nezávislým rizikovým faktorem pro řadu stavů, jako je předčasný porod, nízká porodní hmotnost, zvýšená vnímavost k infekci virem HIV, chlamydiových a gonokokových infekcí (Saraf a kol., 2021). V těhotenství byla BV spojována s předčasným porodem, potratem, sepsí po potratu a s poporodní endometritidou (Lamont a kol., 2011). Může být symptomatická nebo asymptomatická v závislosti na stupni dysbiózy, virulenci kolonizujícího patogenu a jeho zátěži (Saraf a kol., 2021).

Zatím však není jasné, zda jsou to patogeny, které způsobují BV, nebo jsou to jen příležitostné bakterie, které využívají vyšší pH a kolonizují vagínu (Punzón-Jiménez a Labarta, 2021).

Na obrázku 2 níže je znázorněna normální vaginální mikroflóra, která se vyznačuje dominancí laktobacilů s různými druhy přispívajícími k různé ochraně proti bakteriální vaginóze v důsledku různé produkce kyseliny mléčné s nízkým výskytem *Gardneralla vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mobiluncus* spp., *Bacteroides* spp., *Prevotela* spp., *Peptostreptococcus* spp, *Fusobacterium* spp. a *Porphyromonas* spp. stejně jako nižší výskyt invazních patogenů.

Také obrázek 2 znázorňuje bakteriální vaginózu během, které je typicky nižší výskyt laktobacilů a zvýšený výskyt *Gardneralla vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mobiluncus* spp., *Bacteroides* spp., *Prevotela* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp. *a Porphyromonas* spp. a vyšší výskyt invazních patogenů, jako jsou virové (HIV), bakteriální (*Neisseria gonorrhoeae*) a parazitární (*Trichomonas vaginalis*) původci (Saraf a kol., 2021).



Obrázek 2- Normální vaginální flóra vs. bakteriální vaginóza (Saraf a kol., 2021)

1.1.3 Vulvovaginální kandidóza

Vulvovaginální kandidóza (VVC) je dysbiotický stav typický nadměrným růstem druhů rodu *Candida* (Kalia a kol., 2020). *Candida albicans* je předním vaginálním kolonizátorem. Vyskytuje se častěji u mikrobioty s převahou laktobacilů druhu *L. iners* (Dabee a kol., 2021; Chee a kol., 2020). Vulvovaginální kandidóza se projeví u 75 % žen alespoň jednou za život. Přibližně u 5–10 % žen s primární epizodou vulvovaginální kandidózy se následně rozvine rekurentní vulvovaginální kandidóza (RVVC) (> čtyři epizody ročně).

Mezi nespecifické příznaky uváděné pacientkami s VVC a recidivující VVC patří vulvální erytém, pruritus, dyspareunie, pocity pálení, bílý hrudkovitý výtok a bolestivost. Ačkoli VVC není život ohrožující, nevyřešená VVC ovlivňuje kvalitu života ženy (Chee a kol., 2020).

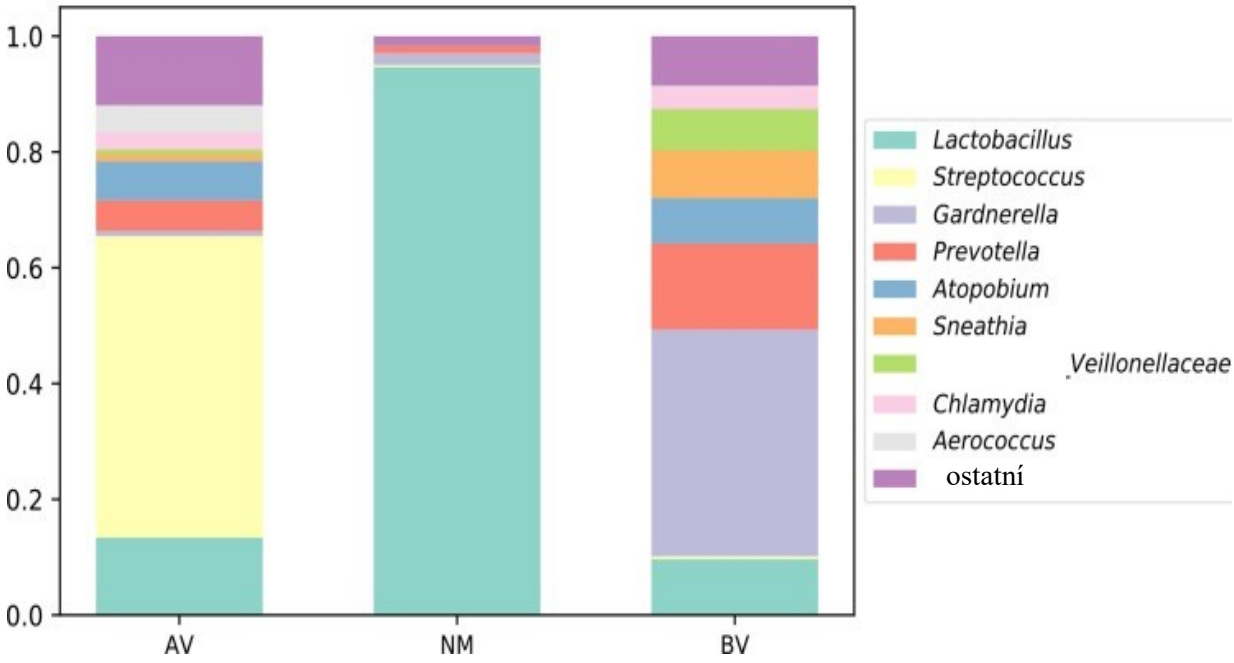
Uvádí se normální vaginální pH (pH ~ 4,5) během VVC, což ukazuje na přítomnost dostatečného počtu laktobacilů k udržení acidifikace pochvy. V souladu s tímto pozorováním Beghini a kol. (2015) uvádí zvýšené hladiny kyseliny mléčné u žen s VVC. Zhou a kol. (2009) a Vylkova a kol. (2011) nezjistili žádný rozdíl ve VMB u žen s VVC a bez VVC. Zároveň prokázali, že ženám s VVC dominují laktobacily. To naznačuje neúspěšné snažení laktobacilů při obraně vaginálního prostředí během VVC.

1.1.4 Aerobní vaginitida

Aerobní vaginitida (AV) je významná abnormalita vaginální mikrobioty (Rampersaund a kol., 2012). Aerobní vaginitida byla poprvé charakterizována v roce 2002 Dondersem jako vaginální stav odlišný od BV, který může vyžadovat odlišnou klinickou léčbu a mít odlišná klinická rizika (Kaambo a kol., 2018). U této poruchy jsou laktobacily nahrazeny aerobními organismy, převážně enterickými komenzály nebo patogeny (Rampersaund a kol., 2012).

Streptokoky skupiny B (GBS), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis* a *Klebsiella pneumoniae* jsou organismy nejčastěji izolované s AV (Smith a Ravel, 2017). U 20 % žen s AV je prokazována *G. vaginalis*, což poukazuje na možné prolínaní s BV. AV bývá dávána do souvislosti s komplikacemi v těhotenství, včetně potratu, chorioamnionitidy a předčasného porodu (Rampersaund a kol., 2012). Onemocnění se projevuje pálením, svěděním, hnisavým výtokem a zarudlou poševní sliznicí (Smith a Ravel, 2017; Tao a kol., 2019). Ženy s AV mívají tenčí vaginální sliznici než ženy s BV, se zvýšeným

počtem intermediálních a parabazálních buněk ve vaginálních nátěrech, což svědčí o zvýšeném obratu a deskvamaci povrchových vrstev epiteliálních buněk (Rampersaund a kol., 2012).



Graf 1- Průměrné zastoupení rodů ve vzorcích s aerobní vaginitidou, normální vaginální mikroflórou a bakteriální vaginózou. *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp. a *Gardnerella* spp. byly převládajícími rody u aerobní vaginitidy, normální vaginální mikroflóry a bakteriální vaginózy. Streptokok byl významně hojnější aerobní vaginitidy než u bakteriální vaginózy a normální vaginální mikroflóry (Tao a kol., 2019)

1.2 Vaginální mikroflóra zdravých žen

Vaginální mikroflóra (VMB) tvoří přibližně 9 % celkové mikroflóry v lidském těle. Tento komplexní ekosystém obsahuje mnoho mikrobiálních druhů v různém počtu a poměru (Sirichoat a kol., 2020). Mikroorganismy žijí ve vzájemném vztahu a vytváří první obrannou linii proti kolonizaci a infekci potenciálně patogenními mikroby jako jsou patogeny způsobující bakteriální vaginózu, infekci močových cest, kandidové infekce a pohlavně přenosné choroby (STD) (Saraf a kol., 2021; Sirichoat a kol., 2020).

Vaginální mikroflóra je dynamické mikroprostředí, kde těhotenství, užívání antikoncepce, menstruační cyklus a sexuální aktivita přispívají k variacím v bakteriálních komunitách.

Lidská pochva může být kolonizována širokou škálou anaerobních a aerobních bakteriálních druhů, ale fyziologicky dominuje přítomnost rodu *Lactobacillus* spp. (Peric a kol., 2019). Druhy jiných rodů, jako jsou *Gardnerella* spp., *Atopobium* spp., *Prevotella* spp., *Corynebacterium* spp., *Anaerococcus* spp., *Peptoniphilus* spp., však mohou za určitých podmínek tvořit většinové populace. Druhy rodů *Enterococcus* spp. a *Streptococcus* spp. jsou často izolovány jako subdominantní populace. Kmeny těchto biotypů, které produkují kyselinu mléčnou by mohly být případně použity jako vaginální probiotika. Tyto probiotika by sloužily k prevenci nebo léčbě vaginálních infekcí, jelikož mohou inhibovat vývoj patogenů. Některé kmeny těchto rodů jsou však také známé jako oportunní patogeny způsobující příležitostná onemocnění (Sirichoat a kol., 2020).

Bylo prokázáno, že *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri* a *L. jensenii* převažují ve vaginální mikrobiotě u zdravých žen v reprodukčním věku v různém poměru. Rod *Lactobacillus* sdružuje asi 120 druhů, z nichž 20 lze prokázat na poševní sliznici. Vaginální mikroflóra zdravých žen zahrnuje obvykle jeden nebo dva druhy laktobacilů (Saraf a kol., 2021). Tyto laktobacily produkují dostatečné množství kyseliny mléčné k udržení nízké hodnoty pod pH 4,5 (Kalia a kol., 2020).

Saunders a kol. (2007) ukazují, že složení vaginální mikroflóry je velice rozmanité a variabilní. Zdravá poševní mikroflóra je tvořena více jak 50 nepatogenními mikrobiálními druhy. Bylo prokázáno také několik anaerobních bakteriálních druhů, což naznačuje, že dominance *Lactobacillus* spp. není nezbytná (Saraf a kol., 2021). Mezi některé tyto druhy patří např. *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Escherichia coli*, *Gardnerella* sp., *Mycoplasma* spp., *Candida albicans*, viry a protozoa o kterých je známo, že obývají vagínu zdravých žen (Li a kol., 2020).

Sekvenováním genu 16 S (rRNA) však vědci prokázali, že významná část (7–33 %) zdravých žen postrádá laktobacily v pochvě. Je známo, že nepřítomnost laktobacilů je doprovázena přítomností dalších mikroorganismů, jako je *G. vaginalis* nebo různé druhy *Peptostreptococcus* spp., *Prevotella* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp. a/nebo *Corynebacterium* spp. Takové změny ve složení poševního mikrobiomu nejsou považovány za patologickou poruchu (Gladysheva a kol., 2022).

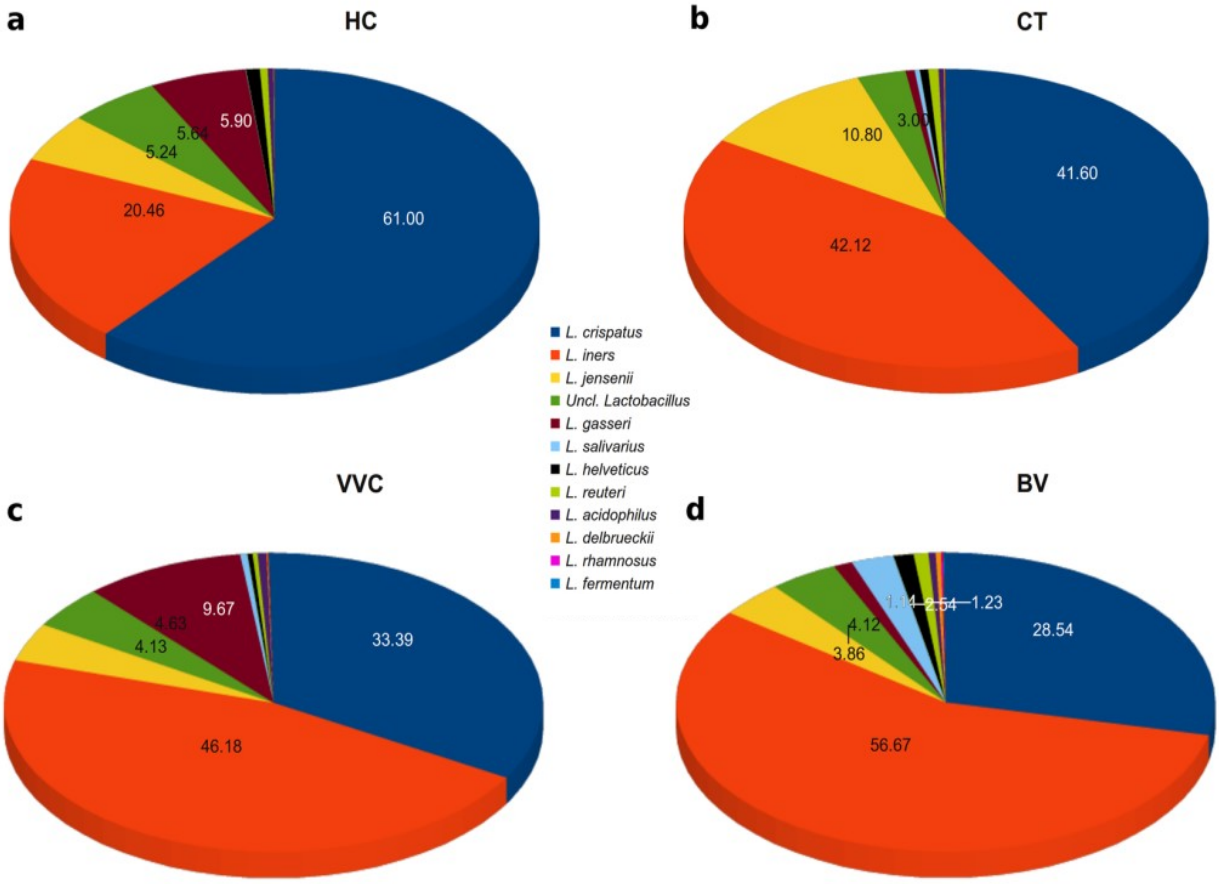
1.3 Rod *Lactobacillus*

Jedná se o fakultativně anaerobní, kataláza-negativní, grampozitivní, nesporotvorné tyčinky, které často lépe rostou za mikroaerofilních podmínek. Jejich morfologie barvení dle Grama se může lišit, včetně krátkých, baculatých tyčinek, dlouhých, štíhlých tyčinek, v řetízcích nebo palisádách. Morfologie kolonií se odvíjí od použitého kultivačního média od malých po středně velké šedé kolonie, které obvykle vykazují alfa hemolýzu na krevním agaru. U lidí se přirozeně vyskytují v gastrointestinálním traktu a pochvě, ale mohou být i oportunními patogeny (Goldstein a kol., 2015).

Lactobacillus a jeho vliv na vaginální flóru

Lamont a kol. (2011) prokázaly dominanci druhu *Lactobacillus* spp. jako hlavní složku vaginální mikroflóry u zdravých žen v reprodukčním věku. Ve vaginální mikrobiotě však existují etnické, rasové, regionální a druhové rozdíly. Druhy *Lactobacillus* spp. byly poprvé izolovány a kultivovány z vaginálního sekretu v roce 1892 Gustavem Döderleinem. Publikoval monografii „Das Scheidensekret“ (Vaginální sekrety), ve které popsal přítomnost bakterií ve tvaru bacilu ve vagině nazývaných Döderleinovy bacilly a později v roce 1928 pojmenovány jako *Lactobacillus acidophilus.*

Laktobacily v pochvě slouží k ochraně poševní sliznice před nepůvodními a cizími infekčními mikroorgaismy. Potenciální schopnosti zabránit kolonizaci patogenů nebo nežádoucích mikrobů propůjčují rezidenční druhy *Lactobacillus* spp. produkcí kyseliny mléčné. Například kyselina mléčná okyseluje vaginální pH (3,5–4,5) a takto nízké pH nabízí ochranu proti virovým (HIV), bakteriálním (*Neisseria gonorrhoeae)* a parazitárním (*Trichomonas vaginalis*) původcům. Druhy *Lactobacillus* spp. ve vagíně také produkují antimikrobiální látky zvané bakteriociny, které jsou proteinové povahy a mají baktericidní účinek na růst jiných bakterií. Některé druhy *Lactobacillus* spp. jsou také známý tím, že produkují peroxid vodíku, který má také antimikrobiální aktivitu, a tím odrazuje od kolonizace patogenními organismy (Saraf a kol., 2021). O'Hanlon a kol. (2013) odhalily, že druhy *Lactobacillus* spp. produkující peroxid mají větší ochranu ve srovnání s těmi, které neprodukují.



Graf 2- Charakterizace rodu *Lactobacillu*s na úrovni druhů. Zastoupení laktobacilů je znázorněno v rámci čtyř skupin. (a) zdravé ženy, (b) C. trachomatis, (c) vulvovaginální kandidóza a (d) bakteriální vaginóza (Ceccarani a kol., 2019)

1.4 Kvasinky

Rod *Candida* (C.), zahrnuje druhy jako je např. *C. albicans*, *C. krusei*, *C. alimentaria*, *C. parapsilosis* a *C. dubliniensis* (Chee a kol., 2020). Barousse a kol. (2004) prokázali, že převážnou část v poševní mikrobiotě zaujímá *C. albicans* (72–91 %).

Candida albicans

C. albicans je polymorfní kvasinka, která je za příznivých podmínek schopna morfogeneze mezi kvasinkami a hyfami. *C. albicans* může kolonizovat vagínu, aniž by způsobovala jakékoli symptomatické infekce. Rizikové faktory, které vedou k rozvoji vulvovaginální kandidózy jsou

hormonální nerovnováha, diabetes, orální sex, intravaginální výplach, samoléčba antimykotiky a antibiotiky, používání nitroděložních tělísek a tržné rány hráze (Kalia a kol., 2020).

Zástupci rodu *Candida*, jsou stále označovány jako oportunní patogeny, i když jsou přítomny u zdravých žen. Powell a Nyirjesy (2014) poukázali na vliv jejich vysoké prevalence (85–95 %) u pacientů trpících VVC, což je druhá nejčastější dysbióza po BV. Některá přijatelná vysvětlení toho, jak *C. albicans* přechází z pouhého kolonizátora na patogen, zahrnují vaginální dysbiózu, expresi faktorů virulence a produkci proteolytických enzymů (Chee a kol., 2020). Kandidy mají schopnost dimorfní změny, což umožňuje přeměnu z formy kvasinkové na hyfální. Kvasinková forma se obvykle vyskytuje u zdravých asymptomatických žen na rozdíl od hyfální formy, která je prokazována u vulvovaginální kandidózy. To podporuje teorii, že kvasinkové formy jsou spojeny s komenzálismem a hyfální naopak s patogenitou (Kalia a kol., 2020).

Nízké pH a baktericidní sloučeniny vylučované laktobacily mají tendenci potlačovat přerůstání *C. albicans* a její přechod z avirulentní kvasinkové formy na virulentní hyfální formu. Niu a kol. (2017) prokázali, že *L. crispatus*, jeden z dominantních členů vaginální mikroflóry, může snížit virulenci *C. albicans* a zvýšit lokální imunitní odpověď vaginálních epiteliálních buněk. Celkově tato studie naznačila, že bakteriobiota vaginální mikroflóry určuje toleranci vůči *C. albicans* ve vagině. Donders a kol. (2000) a Lai a kol. (2009) prokázali spojitost nedostatku laktobacilů s náchylností k symptomatické VVC a dalším infekcím dolního genitálního traktu včetně bakteriální vaginózy a větší vnímavost k HIV. Všechna tato zjištění naznačují, že hojnost laktobacilů a nízký počet *C. ablicans* spolu s jejich interakcemi hrají důležitou roli při udržování rovnováhy mikroflóry a narušení v tomto může vést k vaginálním infekcím (Kalia a kol., 2020).

Candida dubliniensis

Candida dubliniensis byla poprvé identifikována Sullivanem a kol. (1995) v Dublinu, Irsko. Jeho klinický význam je spojen s rozvojem rezistence na flukonazol a invazivních onemocnění u imunokompromitovaných hostitelů (Jan a kol., 2022). *C. dubliniensis* je velmi podobná *C. albicans*, pokud jde o genotypové a fenotypové charakteristiky (Vidotto a kol., 2003). Bohužel díky podobnosti *C. albicans* byla *C. dubliniensis* dlouhou dobu přehlížena a chybně identifikována (Jan a kol., 2022). Stává se však klinicky významnou kvasinkou díky svému celosvětovému rozšíření a souvislosti se slizniční i systémovou kandidózou

(Vidotto a kol., 2003). VVC je běžné a vysilující dlouhodobé onemocnění, které postihuje miliony žen na celém světě. Toto onemocnění je způsobeno převážně *C. albicans* a v menší míře *C. dubliniensis* (Shokoohi a kol., 2021).

Kvasinka byla izolována nejen v ústní dutině imunokompromitovaných pacientů, ale také v plicích, pochvě, krvi, sputu a gastrointestinálním traktu (Vidotto a kol., 2003). *C. dubliniensis* vykazuje zvýšenou adherenci k buňkám bukálního epitelu na rozdíl od *C. albicans* (Asadzadeh a kol., 2019).

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces (S.) *cerevisiae* je ascomycetózní kvasinka široce používaná v pekařském a pivovarnickém průmyslu (Posteraro a kol., 1999). Běžně je *S. cerevisiae* považována za nepatogenní. Mccullough a kol. (1998) prokázali, že za určitých okolností, zvláště u pacientů s oslabenou imunitou, se může projevit jako patogen. Vaginální kolonizace a symptomatická vaginitida způsobená *S. cerevisiae* jsou extrémně vzácné a výskyt vaginálních infekcí způsobených touto kvasinkou se odhaduje na méně než 1 %. Agatensi a kol. (1991) uvádějí oproti tomu vyšší výskyt (tj. 5,5 %) infekce *S. cerevisiae* u italských žen.

Většina vulvovaginálních mykóz je způsobena zástupci rodu *Candida* (zejména *C. albicans*). Vulvovaginální mykózy způsobené *S. cerevisiae* mohou souviset s častějším použitím flukonazolu a itrakonazolu, které jsou na kvasinky tohoto rodu neúčinné (Savini a kol., 2013). Jedná se o vaginální a systémové azolované látky, vykazující špatnou aktivitu proti tomuto organismu. Tímto se řadí mezi jeden z faktorů, který může přispívat k rozvoji tohoto onemocnění (Posteraro a kol., 1999).

1.5 Rod *Gardnerella*

Rod *Gardnerella* je řazen do čeledi *Bifidobacteriaceae.* Buňky jsou malé, nepohyblivé, nezapouzdřené, nesporulující, gramlabilní tyčinky s průměrnými rozměry 0,4×1,0~1,5 μm. Podle nároků na kyslík je řadíme mezi fakultativně anaerobní mikroorganismy.

Gardnerella vaginalis

G. vaginalis je kultivačně náročný mikroorganismus vyžadující komplexní kultivační média. Roste při teplotě 37 °C v komplexních médiích v atmosféře s 5–10 % oxidu uhličitého. Nicméně bylo prokázáno, že určité kmeny *G. vaginalis* jsou striktní anaeroby.

Buněčný povrch *G. vaginalis* je pokryt fimbriemi, které jsou zodpovědné za adhezi *G. vaginalis* k buňkám vaginálního epitelu.

G. vaginalis je kataláza negativní, oxidáza negativní a b-glukosidáza negativní. Může fermentovat škrob, dextrin, sacharózu, glukózu, fruktózu, ribózu, maltózu a rafinózu. Některé kmeny mohou také fermentovat xylózu a trehalózu. Naopak *G. vaginalis* není schopna fermentovat rhamnózu, melibiózu, mannitol a sorbitol (Qin a Xiao, 2022).

G. vaginalis je nejběžnějším mikroorganismem identifikovaným z vaginálních vzorků žen s BV. K rozvoji tohoto onemocnění dochází narušením vaginální mikroflóry, zvýšením pH >4,5 a snížením druhů *Lactobacillus* spp. Samotná přítomnost *G. vaginalis* na poševní sliznici ještě nevede k rozvoji bakteriální vaginózy (Chen a kol., 2021; Alfraji a kol., 2020).

1.6 Rod *Ureaplasma*

Druhy *Ureaplasma* z čeledi *Mycoplasmataceae* jsou aerobní až fakultativně anaerobní gramnegativní bakterie a mají pleomorfní, variabilní, vezikulární tvar (Schenk a kol., 2021), (Noh a kol., 2019). Nemají buněčnou stěnu a jsou obklopeny pouze plazmatickou membránou, která je v kontaktu s povrchem hostitelské buňky prostřednictvím membránových proteinů spojených s lipidy. Jejich patogenita je charakterizována produkcí prozánětlivých cytokinů a také jejich schopností indukovat apoptózu v monocytech a makrofázích. *Ureaplasma* jsou potenciálně patogenními bakteriemi v urogenitálním traktu člověka (Schenk a kol., 2021).

Ureaplazma urealyticum

Arena a Daccò (2021) izolovali *Ureaplasma* (U.) *urealyticum* jako čtvrtý nejčastější mikroorganismus ve vaginální flóře. *U. urealyticum* se podílí na řadě infekčních onemocnění, jako je negonokoková uretritida, mužská neplodnost, BV, chronická endometritida, zánětlivé onemocnění pánve, spontánní potrat, předčasný porod a chorioamnionitida (Noh a kol., 2019).

1.7 Rod *Mycoplasma*

Rod *Mycoplasma* je charakterizována chyběním rigidní buněčné stěny a jedním z nejmenších genomů mezi bakteriemi (Margarita a kol., 2020). Společně s ureaplazmaty se řadí mezi nejčastější sexuálně přenosné původce bakteriální infekce (Paira a kol., 2021).

Mycoplasma hominis

Mycoplasma (M.) *hominis* může kolonizovat lidský ženský urogenitální trakt. Diaz a kol. (2010) a Rumyantseva a kol. (2019) stanovili ve svých studiích prevalenci *M. hominis* ve vaginální mikroflóře od 1,3 do 51 %. *M. hominis* lze nalézt u zdravých i symptomatických žen, jeho přítomnost je spojena se změnami vaginální flóry, včetně bakteriální vaginózy (Margarita a kol., 2020). Arya a kol. (2001) izolovali *M. hominis* ve vagíně u 341 žen, ale jeho míra izolace a počet kolonií mezi pacientkami se symptomy se významně nelišily od těch bez symptomů v jednotlivých kategoriích onemocnění. Ženy měly stanovené odlišené diagnózy např. bakteriální vaginóza, kandidodóza, genitální bradavice, chlamydiové infekce. Smaoui a kol. (2019) prokázali *M. hominis* u žen s potratem.

1.8 Rod *Corynebacterium*

Rod *Corynebacterium* (C.) zahrnuje grampozitivní tyčinky, rovné či mírně zakřivené, které mohou být uspořádány do palisád. Jsou kataláza pozitivní, nepohyblivé, nesporulující a fakultativně aerobní (Gladysheva a kol., 2022; Glandysheva a kol., 2016).

Vaginální mikrobiom zdravých žen obsahuje nedifterické korynebakterie. Role a funkce nedifterických korynebakterií ve vaginální mikroflóře jsou stále předmětem studia. Rod *Corynebacterium* je tvořen přibližně 130 různými druhy. Nedifterická korynebakteria tvoří se *Staphylococcus epidermidis* hlavní část, přibližně 80 % vaginální mikrobioty, u prepubescentních dívek. Zvyšuje se také počet nedifterických korynebakterií u těhotných žen a žen po porodu. Přes vysokou frekvenci výskytu nedifterických korynebakterií v ženském genitálním traktu se studie na toto téma omezují především na popis patogenů (Gladysheva a kol., 2022). *Corynebacterium* spp., které jsou izolovány od zdravých žen, mají potenciální probiotické vlastnosti. Metabolity těchto bakterií významně zvýšily antagonistickou aktivitu laktobacilů produkujících peroxid, inhibovaly růst a tvorbu biofilmu a inhibovaly 24hodinové kultury patogenní a oportunně patogenní mikroorganismy (Gladysheva a kol., 2017).

Corynebacterium amycolatum

Gladysheva a kol. (2022) prokázali, že *C. amycolatum* je poměrně často izolováno z vaginálních vzorků zdravých žen a vyznačuje se vysokým probiotickým potenciálem. Analýza genomů *C. amycolatum* odhalila geny zodpovědné za adaptaci a přežití ve vaginálním

prostředí, včetně genů odolnosti vůči kyselému prostředí a oxidativnímu stresu. Byly identifikovány geny odpovědné za produkci H_2O_2 a syntézu sekundárních metabolitů, esenciálních aminokyselin a vitamínů. Metabolity *C. amycolatum* značně zvýšily antagonistickou aktivitu laktobacilů produkujících peroxid proti patogenním a oportunním mikroorganismům a měly silnou antimikrobiální aktivitu proti oportunním patogenům, jako jsou *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa*.

Corynebacterium aurimucosum

Corynebacterium (C.) *aurimucosum* je fakultativně anaerobní a roste v mírně nažloutlých kolonií. Vzorky, ve kterých je *C. aurimucosum* prokázáno pocházejí převážně z urogenitálního ústrojí žen. V roce 2002 bylo *C. aurimucosum* taxonomicky popsáno jako nový druh v rámci rodu *Corynebacterium* (Trost a kol., 2010). Přítomnost *C. aurimucosum* v moči byla také spojena s infekcemi močových cest (UTI) (Eskandar a kol., 2020). Neobvyklé černě pigmentované varianty *C. aurimucosum* (původně pojmenované jako *C. nigricans*) jsou nadále získávány z ženského urogenitálního traktu a jsou spojeny s komplikacemi během těhotenství (Trost a kol., 2010).

1.9 Rod *Cutinebacterium*

Rod *Cutinebacterium* (C.) zahrnuje grampozitivní anaerobní bakterie, které řadíme mezi oportunní patogeny (Achermann a kol., 2018). *Cutinebacteirum* spp. jsou převládající složkou kožní flóry na sliznici dutiny ústní, střev, močové trubice a vagíny (Meredith a Ulrich, 2013).

Cutibacterium avidum

C. avidum je grampozitivní, anaerobně-aerotolerantní tyčinka, která se přirozeně vyskytuje na povrchu kůže. Popis rodu *Cutibacterium* změnil taxonomii druhů *Propionibacterium*. Tyto organismy stále patří do skupiny kožních koryneformních mikroorganismů a nejvíce studovaným druhem zůstává *Cutibacterium acnes*. *C. avidum* se může projevit jako oportunní patogen způsobující povrchové nebo hluboké invazivní infekce.

C. avidum má tendenci pobývat v oblastech obsahujících ekrinní potní žlázy. Nejčastěji je detekován ve vlhkých oblastech (nos, axila, třísla a konečník, které zahrnují oblasti osídlené enterickými gramnegativními bakteriemi) (Corvec a kol., 2018).

1.10 Rod *Actinomyces*

Actinomyces spp. jsou definovány jako heterogenní skupina anaerobních, nesporulujících, acidorezistentních, grampozitivních tyčinek, které jsou spojeny s aktinomykózou, vzácným chronickým granulomatózním onemocněním (Van Hoecke a kol., 2013). *Actinomyces* spp. obývají orofaryngeální, genitální a střevní sliznici člověka i zvířat (Martínez a Ovalle, 2011).

Actinomyces urogenitalis

Actinomyces (A.) *urogenitalis* je rovná až mírně zakřivená tyčinka s rudimentární schopností větvení. Je fakultativně anaerobní a kataláza negativní. Roste na krevním agaru, kde tvoří malé, šedé a lesklé kolonie po 48 hodinách inkubaci v 3 % CO^2. Má sacharolytickou aktivitu a štěpí glukózu, maltózu, laktózu, sacharózu, xylózu, trehalózu, melibiózu a melezitózu, je variabilní vůči arabinóze, mannitolu, ribóze a nevyužívá glykogen (Martínez a Ovalle, 2011).

Actinomyces urogenitalis byl popsán jako nový druh v roce 2000 na základě charakterizace tří izolátů získaných z lidského urogenitálního traktu. Od té doby se ukázalo, že *A. urogenitalis* je součástí normální flóry lidské pochvy. Kolonizace vysokými koncentracemi *A. urogenitalis* může nastat v případech bakteriální vaginózy, ale její role v patogenezi je nejasná (Corvec a kol., 2018). S. Elsayed a kol. (2006) vyizolovaly *A. urogenitalis* od mladé ženy z nitroděložního antikoncepčního tělíska, která trpěla aktinomykózou.

1.11 Rod *Staphylococcus*

Druhy rodu *Staphylococcus* (S.) jsou grampozitivní, nepohyblivé, kataláza-pozitivní, oxidáza-negativní a fakultativně aerobní koky (Frank a kol., 2008). Níže zmíněné druhy se řadí do skupiny koaguláza-negativních stafylokoků (CoNS).

Staphylococcus epidermidis

Je jedním z pěti významných mikroorganismů, které se nacházejí na lidské kůži a sliznicích. Způsobuje nozokomiální infekce spojené s použitím lékařských implantátů a přístrojů (Ebrahimzadeh a kol., 2014). *S. epidermidis* je oportunní patogen, který kolonizuje sliznice, axily, hlavu a nos (Guo a kol., 2019).

Staphylococcus hominis

Staphylococcus hominis je součástí lidské mikroflóry, druhý v četnosti po *Staphylococcus epidermidis* (Coates-Brown a Horsburgh, 2017). Mezi CoNS je *S. hominis* běžným druhem

vyskytujícím se v klinických vzorcích, obvykle izolovaný z podpaží a paží, nohou a trupu lidí (Jiang a kol., 2012). Navzdory svému komenzálismu je *S. hominis* klinický patogen schopný způsobit infekci v různých oblastech, zejména v přítomnosti katetru nebo cizích těles v urogenitálním traktu (Coates-Brown a Horsburgh, 2017). Je stále více považován za potenciálně oportunní a nozokomiální patogen a může příležitostně způsobit infekci u pacientů s abnormálně slabým imunitním systémem (Jiang a kol., 2012).

Staphylococcus lugdunensis

Druh *S. lugdunensis* je to součástí mikrobiomu lidské kůže, která je spojena hlavně s dolními částmi těla a končetinami, zejména ve vlhkých oblastech, jako je tříselná rýha a hráz a pod nehtem velkého palce. Také *S. lugdunensis* lze nalézt v nosní dutině, ale méně často než na jiných místech těla (Heilbronner a Foster, 2021). *S. lugdunensis* je složkou normální lidské kožní flóry a vzácně se vyskytujícím, ale nikoli vzácným lidským patogenem (Frank a kol., 2008). *S. lugdunensis* bezpochyby představuje nejagresivnější druh CoNS. Na rozdíl od jiných CoNS může *S. lugdunensis* způsobit závažné infekce podobné těm, které způsobuje *S. aureus*. Způsobuje širokou škálu infekcí, včetně infekcí kůže a měkkých tkání, infekcí kostí a kloubů, infekcí kloubů, infekcí souvisejících s cévním katetrem a abscesů (Heilbronner a Foster, 2021).

Staphylococcus warneri

Staphylococcus warneri patří do klinicky definované skupiny *Staphylococcus epidermidis* v rámci rodu *Staphylococcus*. Je méně virulentní než *S. aureus* a lze jej obvykle detekovat na povrchu lidského těla, na zvířatech a ve fermentovaných potravinách. Přestože jsou stále častěji hlášeny klinické případy související se *S. warneri*, o růstu a dělení tohoto druhu víme stále jen málo. *S. warneri* je blízký příbuzný *S. aureus* a jedná se o koaguláza-negativní druh (Su a kol., 2020). Tento oportunní patogen, který je schopen způsobit několik infekcí, zejména u pacientů se zabudovanými katetry a náhradami. *S. warneri* je spolu s *S. epidermidis* jednou z převládajících koaguláza-negativních stafylokokových bakterií obývajících kůži u zdravých lidí (Sun a kol., 2021). *S. warneri* byl také izolován z děložního čípku ženy s nevysvětlenou neplodností (Pant a kol., 2019).

1.12 Rod *Streptococcus*

Bakterie rodu *Streptococcus* (S.) jsou prvními obyvateli dutiny ústní, které lze získat hned po narození a hrají tak důležitou roli při sestavování ústní mikroflóry (Abranches a kol., 2018). *Streptococcus* skupiny B (GBS) je β-hemolytická grampozitivní bakterie, která celosvětově kolonizuje dolní genitální trakt přibližně 18 % žen jako asymptomatický člen gastrointestinální a/nebo vaginální flóry. Pokud se však GBS usadí v jiných hostitelských nikách, je vysoce patogenní. Během těhotenství je vzestupná GBS infekce z pochvy do nitroděložního prostoru spojena s předčasným porodem, porodem mrtvého dítěte a poraněním plodu (Armistead a kol., 2019).

Streptococcus anginosus

Streptococcus anginosus je komenzální mikroorganismus nacházející se v lidské ústní dutině, genitourinárním traktu a gastrointestinálním traktu. *S. anginosus* je oportunní patogen, který je schopen přežít v kyselých podmínkách. Adheruje k exponovaným bazálním membránám lidských a kultivovaných epiteliálních buněk a lyzuje erytrocyty a některé typy epiteliálních buněk (Tao a kol., 2019). *S. anginosus* je patogen zapojený do infekcí urogenitálního a gastrointestinálního traktu (Zuñiga-Bahamon a kol., 2016).

S. anginosus se v posledních kazuistikách jeví jako nově se objevující patogen kolonizující vaginu pacientek s AV (Tao a kol., 2019). Byl izolován nejen u AV, ale také u pacientek trpící BV (Zuñiga-Bahamon a kol., 2016). *S. anginosus* způsobuje lýzu vaginálních epiteliálních buněk, což ukazuje, že *S. anginosus* je AV patogen. Tao a kol. (2019) zabývající se *S. anginosus*, u pacientek s tímto dominantním druhem, prokázali hnisavý výtok a 5 z těchto pacientek si stěžovalo na svědění. Kromě toho všechny pacientky, u kterých bylo zjištěno zarudnutí vaginální stěny během gynekologického vyšetření, měly větší výskyt *S. anginosus* v porovnání s ostatními druhy.

Streptococcus salivarius

Ačkoli je *S. salivarius* primárně považován za člena lidské orální mikrobioty, byl izolován z vaginálního traktu přibližně u 2 % těhotných žen. *S. salivarius* kolonizuje sliznici lidského orofaryngeálního traktu a některé kmeny byly vyvinuty pro použití jako orální probiotika, kvůli jejich produkci rozmanitého sortimentu bakteriocinů s inhibiční aktivitou, která je namířena zejména proti členům jiných druhů *Streptococcus* (Patras a kol., 2015).

Streptococcus agalactiae

Streptococcus agalactiae je streptokok skupiny B (GBS). Invazivní onemocnění způsobené infekcí streptokokem skupiny B (*Streptococcus agalactiae*) má za následek široké spektrum klinických onemocnění (Raabe a kol., 2019). GBS je β-hemolytický, grampozitivní kok, který asymptomaticky kolonizuje dolní genitální a gastrointestinální trakt (Armistead a kol., 2019). *S. agalactiae* taktéž kolonizuje rektovaginální trakt u 20 % až 30 % žen a během těhotenství se může přenést na novorozence a způsobit závažné invazivní onemocnění (Patras a kol., 2015). Lancefield popsal GBS kolonizaci vaginálního traktu asymptomatických žen, avšak patogenita byla popsána až v roce 1938, kdy byly publikovány tři zprávy o fatální poporodní infekci (Raabe a kol., 2019). Plody a novorozenci jsou jedinečně náchylní k infekcím GBS, které nejčastěji zahrnují sepsi, zápal plic, meningitidu a encefalopatii (Armistead a kol., 2019).

1.13 Rod *Enterococcus*

Enterokoky jsou grampozitivní koky, které se vyskytují v párech nebo krátkých řetězcích, netvoří spory, jsou kataláza a oxidáza negativní a fakultativně anaerobní. Rod *Enterococcus* patří k bakteriím mléčného kvašení (LAB) a představuje třetí největší rod LAB po *Lactobacillus* a *Streptococcus*. *Enterococcus* (E.*) faecium* a *E. faecalis* patří mezi nejvýznamnější druhy.

Enterokoky jsou všudypřítomné mikroorganismy, které se mohou vyskytovat v různých prostředích, jako je půda, voda, odpadní vody a rostliny (Braïek a Smaoui, 2019). Nacházejí se ve střevní flóře a méně často ve vagíně nebo v ústech (Krawczyk a kol., 202). Kromě toho je známo, že patří do komenzální mikrobioty lidí a zvířat. V současné době *E. faecalis* převládá u druhu *Entercoccus* v gastrointestinálním traktu, následuje *E. faecium*, dále *E. durans* a *E. hirae* (Braïek a Smaoui, 2019).

Enterococcus faecalis

E. faecalis je častou příčinou genitourinárních infekcí, subakutní bakteriální endokarditidy, abdominálních abscesů a infekcí ran (Ma a kol., 2022). Jedná se o běžné patogeny způsobující UTI (Ricci a kol., 2018). Řadí se mezi patogenní bakterie, které mohou způsobovat aerobní vaginitidu, i když nejsou zcela typickými mikroorganismy definující AV (Ma a kol., 2022; Ricci a kol., 2018).

1.14 Rod *Escherichia*

Velká čeleď *Enterobacteriaceae* zahrnuje různé neškodné komenzály, ale také mnoho dobře charakterizovaných střevních patogenů, jako je *Escherichia* (E.) *coli*, *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium, *Yersinia enterocolitica* a další. Kolonizují a replikují se ve střevním traktu a mají schopnost pronikat do hlubších tkání. Téměř všechny jsou fakultativní anaeroby. Fermentují glukózu, redukují dusičnany na dusitany a mají negativní oxidázovou reakci. S výjimkou *Shigella* a *Klebsiella*, které jsou nepohyblivé, mají tyto bakterie peritrichózní bičíky. *Enterobacteriaceae* zahrnují některé z běžných obyvatel gastrointestinálního traktu, a proto se někdy označují jako enterosolventní (Heroven a kol., 2017).

Escherichia coli

Infekce močových cest (UTI) jsou ročně diagnostikovány u více než 7 milionů žen a jsou nejčastěji způsobeny *E. coli* (Hesham a kol., 2021). Jedná se o další recidivující urogenitální onemocnění, které je běžné u žen a je spojeno se špatnými výsledky těhotenství (Deitzler a kol., 2016). Více než 80 % infekcí močových cest je způsobeno uropatogenní *Escherichia coli* (Brannon a kol., 2020). Vaginální laktobacily jsou považovány za ochranné proti *E. coli* díky baktericidní aktivitě. Existuje souvislost mezi přítomností vaginálních laktobacilů a *E. coli* u žen s recidivujícími infekcemi močových cest. Ženy s BV (a tedy nízkými hladinami vaginálních laktobacilů) jsou vystaveny zvýšenému riziku UTI (Hesham a kol., 2021).

Prabha a kol. (2011) a Safarpourdehkourdi a kol. (2014) udávají vysokou prevalenci *E. coli* ve vaginální oblasti žen s vysvětlitelnou i nevysvětlenou neplodností.[76] Močový a reprodukční systém jsou spolu úzce propojeny a infekce jednoho systému se mohou snadno přenášet na druhý. Je zdokumentováno, že ženy, které mají recidivující UTI, mají vyšší frekvenci a rozsah vaginální kolonizace *E. coli*. Bakteriální vyšetření vaginálních epiteliálních buněk žen s recidivujícími infekcemi močových cest potvrdilo vysokou přítomnost kmenů E. coli.

Safarpoor a kol. (2020) poukazuje, že neplodné ženy s anamnézou UTI měly významně vyšší zastoupení druhu *E. coli.* Neplodné ženy s anamnézou infekce močových cest také měly vyšší distribuci multirezistentních kmenů UPEC. Kmeny UPEC mohou mít významnou roli ve výskytu neplodnosti u žen s anamnézou UTI. Přesná role kmenů UPEC jako pravděpodobné příčiny ženské neplodnosti je stále předmětem zkoumání.

1.15 Neplodnost žen

Světová zdravotnická organizace definuje neplodnost jako „onemocnění reprodukčního systému definované neschopností dosáhnout klinického těhotenství po 12 a více měsících pravidelného nechráněného pohlavního styku“. Postihuje asi 8–12 % párů na celém světě; tato prevalence se v posledních desetiletích zvýšila. Velký podíl na neplodnosti mají mikrobiologické faktory, ale pozornost se soustředila především na patogenezi infekce způsobené patogeny (Zhang a Chen, 2021). U některých párů je diagnostikována nevysvětlitelná neplodnost (UE), protože základní mechanismy zůstávají nedefinovány i po posouzení ovulační funkce, průchodnosti vejcovodů a parametrů spermií (Patel a kol., 2022). U žen hraje složení vaginální mikrobioty roli v ženské neplodnosti. Dysbióza vaginální mikroflóry nebo invaze patogenů může poškodit plodnost přímým snížením motility a vitality spermií nebo nepřímo vyvoláním organických poranění reprodukčního systému. Nicméně vlivy normální vaginální mikroflóry na ženskou plodnost nebyly dosud objasněny.

U párů postižených neplodností je 26–30 % případů způsobeno mužskými faktory, zatímco 45–60 % ženskými faktory. Mužská neplodnost je obvykle způsobena nedostatkem spermatu a spermií. Infekce a záněty urogenitálního traktu tvoří více než 12 % mužské neplodnosti (Zhang a Chen, 2021).

1.15.1 Vaginální flóra neplodných žen

Mania-pramanik a kol. (2009) předpokládají, že vaginální mikrobiom spojený s bakteriální vaginózou je příčinou neplodnosti u žen v reprodukčním věku. Wright a kol. (2008) odhalují výskyt neplodnosti 7,4 % u amerických žen ve věku 15–44 let. Ženy s idiopatickou neplodností mají větší pravděpodobnost, že budou mít abnormální vaginální flóru.

Sirota a kol. (2014) prokázali důležitou roli vaginálního mikrobiomu během implantace embrya a vliv na výsledek těhotenství. Kolonizace vagíny *L. crispatus*, který produkuje peroxid vodíku má výrazný vliv na zvýšení míry implantace embrya a porodu. Zároveň snižuje šance na nepříznivý výsledek těhotenství.

Oostrum a kol. (2013) uvádějí, že 19 % neplodných žen má bakteriální vaginózu a 39 % žen má střední vaginální flóru. Kromě toho je bakteriální vaginóza častější u neplodných žen ve srovnání s fertilními ženami stejné věkové skupiny a je spojena se sníženou mírou početí.

Tato zjištění posilují skutečnost, že hojnost druhů *Lactobacillus* spp. je charakteristickým znakem normální zdravé vaginální flóry (Saraf a kol., 2021).

1.15.2 Spojitost mikroorganismů s neplodností žen

Infekce dělohy je známým rizikovým faktorem neplodnosti, protože toto patogenní prostředí může způsobit zánět a aktivaci imunity v endometriu, což narušuje implantaci embrya a nástup úspěšného těhotenství (Moreno a kol., 2018). *Chlamydia* (C.) *trachomatis* a *Neisseria* (N.) *gonorrhoeae* jsou nejčastějšími patogeny u sexuálně přenosných urogenitálních infekcí a uropatogenní *Escherichia coli* (UPEC) představuje většinu případů ascendentních urogenitálních infekcí. Ženská neplodnost je většinou způsobena infekcemi a záněty, jako je salpingitida a vaginitida. *N. gonorrhoeae* a *C. trachomatis* jsou nejčastěji uváděnými patogeny, které vedou k salpingitidě. Uváděny jsou i další patogeny, jako je *Mycoplasma genitalium* a *Trichomonas vaginalis*. BV je nejčastější vaginitida u žen v reprodukčním věku, přibližně 40–50 % případů vaginitidy je BV. Vaginální kandidóza (20–25 %) a trichomoniáza (15–20 %) jsou druhou a třetí nejčastější vaginitidou. Celkem 10–20 % případů neplodnosti je nevysvětlených. Vzhledem k tomu, že mikrobiologické faktory tvoří velký podíl známé neplodnosti, je racionální studovat mikrobiologicky indukovanou neplodnost za nezánětlivých podmínek (Zhang a Chen, 2021).

Michou a kol. (2013) prokázali přítomnost *U. urealyticum* a *M. hominis* u neplodných žen polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Oba tyto mikroorganismy kolonizují ženský a mužský reprodukční trakt, ale studie prokázaly, že jde o sexuálně přenosné oportunní patogeny schopné způsobit asymptomatické chronické poruchy postihující ženskou a mužskou plodnost (Paira a kol., 2021).

Gardnerella vaginalis a případný koexistující nedostatek *Lactobacillus* spp. je spojen se stavem neplodnosti. Nedostatek flóry s převahou *Lactobacillus* spp. v endometriu souvisí s opakujícím se selháním uhnízdění embrya (Vitale a kol., 2022).

Komplexní interakce druhu *Lactobacillus* spp. hraje klíčovou roli pro rovnováhu normální vaginální flóry a zejména vhodné hladiny *Lactobacillus crispatus* se účastní jako ochranný faktor pro asymptomatickou BV (většinou udržovanou *Ureaplasma* sp. a *Gardnerella vaginalis*), která je uznávána jako potenciální faktor zhoršující plodnost (Vitale a kol., 2022).

1.15.3 Spojitost mikroorganismů s neplodností mužů

Na základě nedávných studií většina normálního spermatu obsahuje bakterie a 30 % vzorků normálního spermatu obsahuje zjevné bakterie, které lze kultivovat. Zánět a infekce způsobené uropatogeny hrají zásadní roli v neplodnosti. Nejběžnější uropatogeny jsou spojeny s dysspermií, mohou ovlivnit kvalitu spermatu při spermatogenezi, rezervaci a oplodnění. Některé uropatogeny mohou přímo zhoršovat výkonnost spermií, ale většina uropatogenů zhoršuje kvalitu spermatu během spermatogeneze (Zhang a Chen, 2021).

UPEC je nejrozšířenějším uropatogenem a má přímý spermicidní účinek. Již v roce 1931 prokázal Rosenthal aglutinační účinek *E. coli* na spermie. Monga a Roberts, (1994) následně prokázaly i jeho imobilizační účinek na spermie.

β-hemolysin izolovaný z druhů rodu *Enterococcus* také zhoršuje motilitu spermií. Pant a kol., (2019) prokázali izolát získaný z děložního čípku ženy s nevysvětlitelnou neplodností, který aglutinoval lidské spermie *in vitro*. Izolát byl identifikován jako *S. warnerii.*

Další dva typy patogenů, které se častěji vyskytují u mužů, jsou genitální ureaplazmata (*Ureaplasma urealyticum* a *Ureaplasma. parvum*) a mykoplazmata (*Mycoplasma genitalium* a *Mycoplasma hominis*) (Huang a kol., 2015).

2 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem práce bylo zjistit výskyt jednotlivých druhů mikroorganismů ve vzorcích odebraných z poševní sliznice a z děložního krčku žen, které podstupují intrauterinní inseminaci (IUI). Dosažené výsledky vyhodnotit ve vztahu ke zdravotnímu stavu pacientek, věku a výsledku intrauterinní inseminace. Tomuto cíli předcházel odběr a transport klinického materiálu do laboratoře.

- Odběr a transport jednotlivých vzorků stěrů do laboratoře.
- Zpracování vzorků a kultivace na vhodných kultivačních médiích.
- Zhotovení mikroskopických preparátů z tamponových stěrů a následné barvení Giemsa-Romanowski barvivem za účelem získání mikrobiálního obrazu poševního.
- Vyhodnocení morfologie kolonií narostlých na kultivačních médiích.
- Diagnostika izolovaných mikroorganismů dle morfologie kolonií, morfologie a uspořádání buněk v mikroskopickém preparátu po obarvení dle Grama, antigenních a biochemických vlastností.
- Detekce druhů *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* metodou PCR.
- Diagnostika mikroorganismů, které nelze určit biochemickými testy, metodou MALDI TOF MS.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Vyšetřovaný materiál

Vyšetřovaným materiálem byly stěry z děložního krčku a poševní sliznice žen podstupujících asistovanou reprodukci v Centru asistované reprodukce SANUS v Pardubicích. Cervikální stěry odebírali lékaři sterilními vatovými tampóny, které byly bezprostředně po odběru umístěny do zkumavek s transportním médiem. K průkazu poševní mikroflóry byl použit tampon ze syntetické bavlny, který byl následně umístěn do Amiesova transportního média s aktivním uhlí. Pro průkaz mykoplazmat a ureaplazmat byl použit sametový endocervikální tampón který byl ponořen do transportního média připraveného v laboratoři (TPPLO bujón).

Spolu s materiálem byly získány i průvodní listy, které obsahovaly informace o zdravotním stavu pacientek.

3.2 Sbírkové kmeny

Referenční kmeny *M. hominis* PG-21 (ATCC 23114) a *U. urealyticum* 2K-160 (ATCC 27618), získané ze Sbírky mikroorganismů Pasteurova institutu v Paříži, sloužily jako pozitivní kontrola při provádění druhově specifické PCR pro průkaz příslušných druhů.

3.3 Přístroje, pomůcky a chemikálie

Přístroje

Laminární box MSC 12 (Jouan S.A., Francie), plynový kahan Bunsen Z1 (Nedform s.r.o, ČR), zákaloměr McFarland densitometr DEN-1B (Biosan, Lotyšsko), třepačka Vortex V-1 plus (Biosan, EU), světelný mikroskop Eclipse 80i (Nikon, Japonsko), pH metr 210 (Hanna instruments, ČR), standartní kombinovaná pH elektroda typ HC 113 (Theta 90, ČR), inkubátor Q-cell 240/60 INOX (Pol Lab, Polsko), CO_2 inkubátor Biocenter (Salvis Lab, Švýcarsko), mraznička a lednička AEG Santo (Elektrolux, Švédsko), digitální váhy 440-43 (Kern, Německo), analytické digitální váhy T5 (Boeco, Německo), vodní lázeň Certomat WR (B. Braun Biotech International AG, Německo), sterilizátor skla Sterimat HS202A (BMT Medical Technology s.r.o., ČR), parní sterilizátor plastů PS20A (Chirana, ČR) a horkovzdušný sterilizátor půd Sterilab BMT (Medical Technology s.r.o., ČR).

Pomůcky

Termotaška na převoz biologického materiálu (BangCo s.r.o., ČR), kovové inokulační kličky, jednorázové sterilní inokulační kličky (10 µl, 1 µl), sterilní zkumavky na transportní médium (10 ml, Syntesys s.r.l., Itálie), rukavice, stojan na zkumavky, podložní sklíčka, sterilní skleněné zkumavky, sterilní gumové zátky, skleněné lahve se šroubovacím uzávěrem (50 ml, 100 ml, 250 ml), Erlenmayerovy baňky (300 ml, 500 ml), odměrné válce (25 ml, 500 ml), sterilní plastové špičky (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl), jednokanálové mikropipety (0,5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl), mikrozkumavky typu Eppendorf (Neptune, USA), sterilní polyesterové Petriho misky 60 mm (Gama group a.s, ČR), sterilní polyesterové Petriho misky 90 mm (VWR, USA), skleněné kádinky.

Transportní zkumavky s výtěrovým tampónem a Amiesovým agarem s aktivním uhlím (Copan, č. š. 210744400), sametové endocervikální tampóny (Copan, č. š. 2022294), biochemické testy STAPHYtest 16 (Erba Lachema s.r.o., č. š. 2003107), ENTEROtest 24 (Erba Lachema s.r.o., č. š. 2102004), EN-COCCUStest (Erba Lachema s.r.o., č. š. 300512), STREPTOtest 24 (Erba Lachema s.r.o., č. š. 1709129), CANDIDA-screen (Erba Lachema s.r.o., č. š. 310913).

Chemikálie

3% peroxid vodíku pro detekci katálazy, OXItest pro detekci cytochromoxidázy (Erba Lachema s.r.o., ČR), roztoky na barvení dle GRAMA: 40% alkoholový roztok krystalové violeti, 10% vodný roztok jodu v jodidu draselném (Lugolův roztok), 10% vodní roztok karbolfuchsinu, destilovaná voda, 70% ethanol, roztok na barvení dle Giemsy: Giemsovo barvivo ředěné destilovanou vodou 1:2 a methanol, fyziologický roztok (0,85% roztok NaCl), imerzní olej, činidla pro biochemické testy, parafínový olej, urea 40% (HiMedia 0000493355).

3.4 Složky pro přípravu kultivačních médií a transportního média

Koňské sérum

Koňské sérum (TSC Biosciences Ltd, č. š. 30507200) o objemu 500 ml, bylo po rozmražení napipetováno po 80 ml do jednotlivých skleněných sterilních lahví a skladováno při teplotě -20 °C.

Kvasnicový extrakt

Kvasnicový extrakt byl připraven následujícím postupem. Čerstvé pekařské kvasnice o hmotnosti 1 kg byly homogenizovány pomocí 500 ml horké redestilované vody a doplněny do 1000 ml redestilovanou vodou. Tato suspenze byla ve vodní lázni zahřívána na teplotu 80 °C po dobu 45 minut za stálého míchání. Poté co byla ochlazena, tak byla umístěna do lednice do druhého dne. Mikropipetou o objemu 5 ml byl opatrně odsát supernatant, tak aby nebyly odebrány kvasinky. Supernatant byl sterilizován filtrací přes filtr Nalgene. Po filtraci byl roztok sterilizován celkem 3x ve vodní lázni při teplotě 80 °C. Po ukončení sterilizace byl tento roztok vyočkován jednorázovými kličkami na krevní agar a Malt agar, aby byla potvrzena jeho sterilita. Následně byl kvasničný extrakt skladován ve skleněných lahvích po 80 ml při teplotě -20 °C.

Octan thallný (10%)

Octan thallný (Sigma-Aldrich s.r.o., č. š. 71K1395) byl připraven následujícím postupem. Bylo odváženo 5 g octanu thallného a toto množství bylo rozpuštěno v 50 ml sterilní redestilované vody. Tento roztok byl následně skladován v ledničce při 4 °C.

L-Arginin

Potřebné množství L-Argininu (BioChemica, č. š. 1K012725) bylo naváženo na předvážkách. L-Arginin byl skladován při laboratorní teplotě.

Roztok fenolové červeně

Roztok byl připraven následujícím postupem. Fenolová červeň (Lachema, č. š. 686981) o hmotnosti 1 g byla rozpuštěna ve 25 ml 0,1 mol/l NaOH. Tento roztok byl doplněn na objem 100 ml sterilní redestilovanou vodou a byl zahříván, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění. Po sterilizaci v autoklávu o teplotě 115 °C byl tento roztok skladován při laboratorní teplotě.

Ampicilin (200 mg/ml)

Antibiotikum bylo připraveno rozpuštěním 1 g ampicilinu (Sigma, č. š. 0000127014) v 5 ml sterilní redestilované vody. Následně bylo pipetováno po 1000 µl do Eppendorfových mikrozkumavek a bylo uchováno při -20 °C.

Linkomycin (265 mg/ml)

Antibiotika Neloren (Sandoz s. r. o., AR9913) o objemu 2 ml byly doplněny na objem 20 ml sterilní redestilovanou vodou. Tyto antibiotika o objemu 2 ml obsahují 600 mg linkomycinu. Vzniklý roztok měl koncentraci 30 mg/ml. Z něho bylo odebráno 500 µl a doplněno na objem 56,6 sterilní redestilovanou vodou. Roztok antibiotik byl skladován v ledničce při 4 °C.

Amfotericin B (1 mg/ml)

Zásobní roztok amfotericinu o koncentraci 10,6 mg/ml (Sigma Aldrich, 063M4043V) a objemu 1 ml byl doplněn na objem 10,6 ml sterilní redestilovanou vodou. Tento roztok byl skladován v ledničce při teplotě 4 °C.

Kyselina chlorovodíková (10%)

Na přípravu 10% kyseliny chlorovodíkové byl použit zásobní roztok 35% kyseliny chlorovodíkové (Lach-Ner s. r. o., č. š. PP/2007/06842/0). Z tohoto roztoku bylo odpipetováno 20 ml a následně bylo zředěno 50 ml redestilované vody. Roztok byl skladován v ledničce při 4 °C.

Hydroxid sodný (10%)

Hydroxid sodný (Penta, č. š. 1810241013) o hmotnosti 5 g byl rozpuštěn v 50 ml redestilované vody. Roztok hydroxidu sodného byl skladován v ledničce při 4 °C.

Síran manganatý

Potřebné množství síranu manganatého o molární hmotnosti 169 g/mol bylo odváženo na analytických vahách. Toto množství bylo následně použito na přípravu agaru pro *Ureaplasma urealyticum*.

3.5 Příprava kultivačních médií

Krevní agar

Na přípravu krevního agaru bylo použito 8,5 g Blood Agar Base No. 2 (HiMedia, č. š. 0000481216). Toto množství bylo rozpuštěno ve 200 ml destilované vody. Agarový základ rozpuštěný v destilované vodě byl sterilizován v autoklávu po dobu cca 2 hodin při teplotě 121 °C. Po vychladnutí na teplotu 50-60 °C bylo přidáno 5 % defibrinované beraní krve. Připravený agar byl následně rozlit do plastových Petriho misek s víčky. Po vychladnutí a ztuhnutí byly agary skladovány v ledničce při teplotě 4 °C.

Čokoládový agar

Na přípravu čokoládového agaru bylo použito 8,5 g Blood Agar base No. 2 (HiMedia, č. š. 0000481216). Toto množství bylo rozpuštěno ve 200 ml destilované vody. Agarový základ rozpuštěný v destilované vodě byl sterilizován v autoklávu po dobu cca 2 hodin při teplotě 121 °C. Při teplotě přibližně 80 °C bylo přidáno 5 % defibrinované beraní krve. Takto připravený agar byl rozlit do plastových Petriho misek s víčky. Po vychladnutí a ztuhnutí byly agary skladovány v ledničce při 4 °C.

Endův agar

Na přípravu Endova agaru bylo použito 3,6 g Endo Agar Base (HiMedia, č. š. 0000115933). Toto množství vylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Agarový základ rozpuštěný v destilované vodě byl sterilizován v autoklávu po dobu cca 2 hodin při teplotě 121 °C. Po zchladnutí byl agar rozlit do Petriho plastových misek s víčky. Po vychladnutí a ztuhnutí byly agary skladovány v ledničce při teplotě 4 °C.

Selektivní agar *Gardnerella*

Selektivní agar pro *G. vaginalis* byl dodán firmou Labmediaservis s.r.o. v ČR. (č. š. 00123)

PPLO agar s močovinou pro *Ureaplasma urealyticum*

Na přípravu bylo potřeba 7 g Difco™ PPLO agaru a 0,3 g síranu manganatého. Obě tyto složky byly rozpuštěny ve 140 ml redestilované vody a pomocí roztoků 10% NaOH a 10% HCl bylo upraveno pH na hodnotu 6,3. Agar byl následně sterilizován po dobu 15 minut při teplotě 121 °C v autoklávu. Po vychladnutí přibližně na teplotu 50-60 °C byl doplněn o další složky.

Mezi tyto složky patří 40 ml koňského séra, 20 ml kvasničného extraktu, 800 µl linkomycinu (256 mg/l), 1 ml ampicilinu (200 mg/ml), 400 µl amfotericinu B (1 mg/ml), 400 µl 40% urey a 400 µl fenolové červeně.

Takto připravená agarová půda byla rozlita do plastových Petriho misek. Po ztuhnutí byly agary skladovány v ledničce při teplotě 4 °C.

PPLO agar pro *Mycoplasma hominis*

Na přípravu bylo potřeba 7 g Difco™ PPLO agaru. Tento agarový základ byl rozpuštěn ve 140 ml redestilované vody a pomocí roztoků 10% NaOH a 10% HCl bylo upraveno pH

na hodnotu 6,3. Roztok byl následně sterilizován po dobu 15 minut při teplotě 121 °C v autoklávu. Po vychladnutí přibližně na teplotu 50-60 °C byl doplněn o další složky.

Mezi tyto složky patří 40 ml koňského séra, 20 ml kvasničného extraktu, 1,6 ml octanu thallného (10% roztok), 1 ml ampicilinu (200 mg/ml).

Takto připravená agarová půda byla rozlita do plastových Petriho misek. Po ztuhnutí byly agary skladovány v ledničce při teplotě 4 °C.

PPLO bujón s močovinou pro *Ureaplasma urealyticum*

Na přípravu PPLO bujónu bylo použito 4,2 g Difco™ PPLO broth (bez krystalové violeti). Tento základ pro bujón byl rozpuštěn ve 140 ml redestilované vody ve skleněné lahvi a následně byl sterilizován 15 minut při teplotě 121 °C v autoklávu. Po vychladnutí přibližně na teplotu 55 °C byl doplněn o další složky.

Mezi tyto složky patří 40 ml koňského séra, 20 ml kvasničného extraktu, 800 µl linkomycinu (256 mg/l), 1 ml ampicilinu (200 mg/ml), 400 µl amfotericinu B (1 mg/ml), 400 µl 40% urey a 400 µl fenolové červeně.

Po přidání všech složek bylo upraveno pH pomocí roztoků 10% NaOH a 10% HCl, tak aby se konečné pH kultivačního média pohybovalo v rozmezí 6-6,3. PPLO bujóny byly skladovány v ledničce při teplotě 4°C.

PPLO bujón s argininem pro *Mycoplasma hominis*

Na přípravu PPLO bujónu bylo použito 4,2 g Difco™ PPLO broth (bez krystalové violeti). Tento základ pro bujón byl rozpuštěn ve 140 ml redestilované vody ve skleněné lahvi a následně byl sterilizován 15 minut při teplotě 121 °C v autoklávu. Po vychladnutí přibližně na teplotu 55 °C byl doplněn o další složky.

Mezi tyto složky patří 40 ml koňského séra, 20 ml kvasničného extraktu, 1 ml ampicilinu (200 mg/ml), 1 g argininu, 1,6 ml octanu thallného (10% roztok) a 400 µl fenolové červeně.

Po přidání všech složek bylo upraveno pH pomocí roztoků 10% NaOH a 10% HCl, tak aby se konečné pH kultivačního média pohybovalo v rozmezí 6,5-6,8. PPLO bujóny byly skladovány v ledničce při teplotě 4°C.

Transportní půda pro *M. hominis* a *U. Urealyticum*

Na přípravu PPLO bujónu bylo použito 4,2 g Difco™ PPLO broth (bez krystalové violeti). Tento základ pro bujón byl rozpuštěn ve 140 ml redestilované vody ve skleněné lahvi a následně byl sterilizován 15 minut při teplotě 121 °C v autoklávu. Po vychladnutí přibližně na teplotu 55 °C byl doplněn o amfotericin B (1mg/ml) a ampicilin (200 mg/ml).

Po přidání složek bylo upraveno pH pomocí roztoků 10% NaoH a 10% HCl na 6,5. Takto hotové transportní médium bylo napipetováno po 3 ml do sterilních zkumavek.

Kultivační médium se sacharidy pro *G. vaginalis*

Byla použita maltóza (Itest. č. š. 1105), manitol (Kulich, č. š. 50820511) a trehalóza (Itest, č. č. 1105). Na přípravu byl použit pepton o hmotnosti 2,25 g (BACTO™Peptone, č. š. 0136007), který byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. Takto připravený základ byl sterilizován 15 minut v autoklávu při 121 °C. Po ochlazení peptonu na 50 °C byly přidány 4 % koňské sérum, 1 g testovaného cukru a 0,1 ml 1,6% bromkresolpurpuru.

3.6 Chemikálie a reagencie pro PCR a elektroforézu

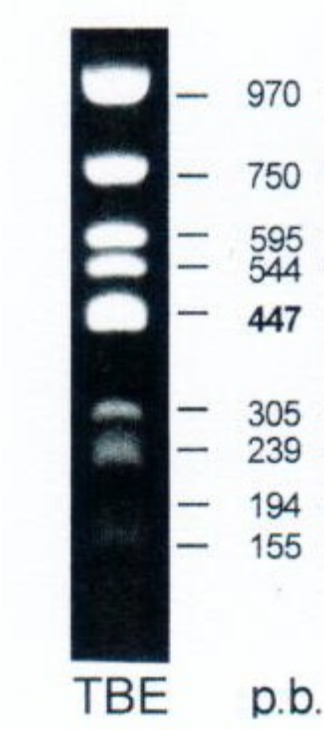
Přístroje pro PCR

Třepačka MS1 Minishaker, (IKA® Works Inc., USA), centrifuga HERMLE Z300K, (Labortechnik, Německo), suché teplo Stuart SBH 200DC (Bibby Scientific Limited Stone, Velká Británie), termocykler (Biometra Professional, Německo), mikrovlnná trouba (LG, Korea), digitální váha SAC 63 (Scaltec, USA), osobní počítač se softwarem Bio-Capt verze 11.02 (Vilbert Lourmat, Francie), UV-transluminátor s CCD kamerou (Vilbert Lourmat, Francie), elektroforetická vana EASYCAST B1A (Sigma, USA), elektroforetický zdroj EC 250-90 (Sigma, USA).

Chemikálie a reagencie pro PCR

Master Mix, Combi PPP (Top-Bio č.š. C208122023, Česká republika). Složení: 1x Combi PPP Master Mix (75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM (NH4)2SO4, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl2, 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 200 µM dTTP, 50 U/ml Taq-Purple DNA polymeráza, monoklonální protilátka anti-Taq (19 nM) stabilizátory a aditiva), primer mh-I (*947R1); 56,12 nmol (Generi-Biotech, s.r.o., ČR), primer mh-II (*947R2); 53,49 nmol (Generi-Biotech, s.r.o., ČR), primer uu-I (*179R8); 35,20 nmol (Generi-Biotech, s.r.o., ČR),

primer uu-II (*179R9); 32,10 nmol (Generi-Biotech, s.r.o. ČR), TBE pufr (10x, složení: TRIS 108 g, kyselina boritá 55 g, 0,5 M EDTA pH 8 40 ml, destilovaná voda 1000 ml), agaróza (Sigma-Aldrich, USA), PCR ethidium bromid (10 mg/ml), Top-Bio, s.r.o., (ČR), DNA marker 155-970 (Top-Bio č.š. C109102023, Česká republika), (Obr. 3) , QIAamp® DNA Mini Kit (50), (QIAGEN GmbH č.š. 169030868, Německo), 96% ethanol (Penta, ČR).



Obrázek 3- Molekulový marker 155-970 (Top-Bio)

3.7 Pracovní postupy

Zpracování vzorků

Vzorek odebraný tampónem ze syntetické bavlny, který byl po provedení stěru pacientky umístěn do Amiesova transportního média s aktivním uhlí, byl nanesen na sterilní sklíčko. Takto zhotovený preparát byl určen pro barvení dle Giemsy. Poté byl vzorek naočkován na vybraná kultivační média. Nejprve na krevní agar, čokoládový agar, selektivní agar pro *Gardnerella* sp. a Endův agar. Inokulum bylo rozočkováno metodou čárkování za účelem získání jednotlivých kolonií. Vzorky odebrané sametovým endocervikálním tampónem byly naneseny a následně rozočkovány na PPLO agary pro ureaplazmata a mykoplazmata. Následně

bylo napipetováno 200 µl TPPLO bujónu do 2 ml PPLO bujónu pro ureaplzmata a mykoplazmata. Do mikrozkumavek byl napipetován 1 ml TPPLO k uchování v teplotě -20 °C.

Krevní agar, čokoládový agar a Endův agar byly inkubovány 48 hodin při 37 °C. Selektivní agar pro *Gardnerella* sp., PPLO agary a PPLO bujóny pro mykoplazmata a ureaplazmata byly inkubovány v 5 % CO_2 48 hodin při 37 °C.

Barvení dle Grama

Barvením dle Grama byly rozlišeny jednotlivé mikroorganismy na gramnegativní a gram pozitivní. Dále byla určena morfologie a uspořádání bakteriálních buněk.

V kapce fyziologického roztoku byla připravena suspenze testovaného kmene. Po zaschnutí byl preparát zafixován plamenem. Následně byl preparát převrstven 40% alkoholovým roztokem krystalové violeti po dobu 15-20 sekund. Po slití barviva byl preparát převrstven Lugolovým roztokem (15-20 s.). Následoval oplach preparátu 70% ethanolem a destilovanou vodou. Komplex barviva se ze stěny gramnegativních bakterií vymývá a následuje dobarvení 10% vodným roztokem karbolfuschinu po dobu 1 minuty. Grampozitivní bakterie si komplex barviva ponechávají. Můžeme pozorovat růžové zbarvení gramnegativních mikroorganismů nebo fialovo-modré zbarvení grampozitivních mikroorganismů.

Barvení dle Giemsy

Materiál ze stěru vaginální sliznice byl tampónem nanesen na sklíčko a byl zafixován methanolem po dobu 3 minut. Následně byl obarven Giemsovým barvivem v poměru 1:2 s destilovanou vodou po dobu 30-60 minut. Po opláchnutí a uschnutí byl obarvený mikrobiální poševní obraz pozorován ve světelném mikroskopu.

Biochemické testy

U vybraných kmenů byly biochemické vlastnosti zjišťovány komerčními testy. Při zaočkování testu a hodnocení výsledků bylo postupováno dle návodu výrobce. Výsledky testů byly hodnoceny identifikačním programem TNW-Lite 7.0 firmy PLIVA – Lachema.

Katalázový test

Kataláza je enzym, který funguje jako katalyzátor rozkladu peroxidu vodíku. K průkazu přítomnosti katalázy byl použit 3% roztok peroxidu vodíku. V pozitivním případě byla pozorována tvorba bublinek na sklíčku po nanesení mikroorganismu.

Oxidázový test

Slouží k identifikaci těch mikroorganismů, které produkují enzym cytochrom c oxidázu. Pomocí napuštěných filtračních proužků oxidačně-redukčním činidlem, byla po nanesení mikroorganismu v pozitivním případě pozorována barevná změna. Tato barevná změna byla modrá až fialovo-modrá.

Fermentace Sacharidů

Schopnost štěpit sacharidy byla zjišťována u izolovaných kolonií, které rostly na selektivním agaru pro *Gardnerella* sp..

Jednotlivé testované cukry byly napipetovány do sterilních skleněných zkumavek a byly zaočkovány neznámým kmenem. Poté byly cukry inkubovány 48 hodin v 5 % CO_2 při 37 °C. Jako kontrola byly použity jednotlivé testované cukry bez zaočkovaného kmene. V pozitivním případě byla pozorována barevná změna z modré na zelenou až žlutou.

3.8 MALDI TOF MS

Vzorky byly stanoveny pomocí přístroje Maldi biotyper sirius systém (Bruker, 189011270400, Německo) v mikrobiologické laboratoři Medila v Pardubicích. Používanou matricí byla kyselina (k.) skořicová, k. trifluoroctová a acetonitril. Pokud se stanovují kvasinky vzorek se nejdříve zakápne 70% roztokem k. mravenčí a následně matricí.

Postup při stanovení

1. Při analýze MALDI byly vzorky připraveny smícháním vzorků s matricí (Matrice lot., č š. 6020121060) na kovové vodivé destičce, což vedlo ke krystalizaci vzorku v matrici.
2. Následně byla kovová destička vložena do hmotnostního spektrometru.
3. Po uplynulé analýze byly vzorky identifikovány na základě hmotnostních spekter mikroorganismů.

3.9 Izolace a detekce DNA u *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*

Izolace genomové DNA z poševních stěrů žen byla prováděna na kolonkách QIAamp® DNA Mini Kit (50), (QIAGEN GmbH č.š. 169030868, Německo). Před použitím nové soupravy byly potřebné reagencie upraveny dle instrukcí výrobce.

3.9.1 Postup při izolaci DNA

1. Vzorky transportního média o objemu 500 µl byly centrifugovány 10 minut při 14000 ot./min..
2. Po odlití supernatantu bylo k sedimentu (80 µl) přidáno 180 µl ATL Buffer a 20 µl Proteinasy K. Následně byla provedena inkubace 3 hodiny při 56 °C.
3. Po inkubaci bylo do zkumavek přidáno 200 µl AL Buffer. Inkubace 10 minut při 70 °C.
4. Následně bylo přidáno 200 µl etanolu. Směs byla vortexována a poté převedena na kolonku s vazebným filtrem.
5. Kolonka byla centrifugována 1 minutu při 8000 ot./min. a převedena na novou sběrnou zkumavku.
6. Do kolonky bylo napipetováno 500 µl AW1 a centrifugováno 1 minutu při 8000 ot./min..
7. Filtr byl opět převeden do nové sběrné zkumavky. Napipetováno 500 µl AW2 a centrifugováno 3 minuty při 14000 ot./min..
8. Filtr byl převeden do nové zkumavky a bylo přidáno 200 µl AE Buffer. Takto připravená kolonka byla inkubována 5 minut při laboratorní teplotě.
9. V závěrečném kroku byla provedena 1 minutová centrifugace při 8000 ot./min.
10. Izolovaná genomová DNA z tamponových stěrů a referenčních kmenů byla uchovávána v mrazničce při -20 °C.

3.9.2 Druhově specifická PCR pro detekci *M. hominis* a *U. urealyticum*

Při detekci *M. hominis* a *U. urealyticum* byly použity primery a podmínky reakce, které navrhli autoři Blanchard a kol. (1993). Složení reakční směsi a podoba primerů je popsána v tabulkách 1, 2 a 3. Reakční podmínky byly převzaty z práce Lalaková (2012).

Tabulka 1- Primery použité pro detekci *Mycoplasma hominis*

Mh1	5´- CAATGGCTAATGCCGGATACGC - 3´
Mh2	5´- GGTACCGTCAGTCTGCAAT - 3´

Tabulka 2- Primery použité k detekci *Ureaplasma urealyticum*

Uu1	5'-CAATCTGCTCGTGAA-GTATTAC-3´
Uu2	5'-ACGACGTCCATAAGC-AACT-3´

Tabulka 3- Složení reakční směsi pro PCR detekci *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealy*ticum

Reagencie	Objem (25 µl)
Combi PPP Master Mix	12,5 µl
5´primer	1 µl
3´primer	1 µl
PCR H_2O	8,5 µl
Templátová DNA	2 µl

Do mikrozkumavek s 23 µl reakční směsi bylo přidáno 2 µl izolované templátové DNA. Reakční podmínky pro amplifikační reakci byly použity následující. Počáteční denaturace 94 °C / 4 minuty, následující denaturace 94 °C / 1 minuta, annealing 61 °C / 1 minuta, extenze 72 °C / 1 minuta a závěrečná extenze 72 °C / 4 minuty.

PCR reakcí byl amplifikován produkt o velikosti 429 bp. pro *U. urealyticum* 334 bp. pro *M. hominis*.

3.9.3 Detekce amplifikovaného produktu

Detekci amplifikovaných fragmentů DNA byla provedena elektroforeticky v 1,5 % agarózovém gelu s obsahem interkalačního barviva. Agaróza (1,2 g) bylo rozpuštěna v 80 ml TBE pufru (1x) a zahřáta v mikrovlnné troubě po dobu 2 minut. Po vychladnutí gelu bylo přidáno 4 µl

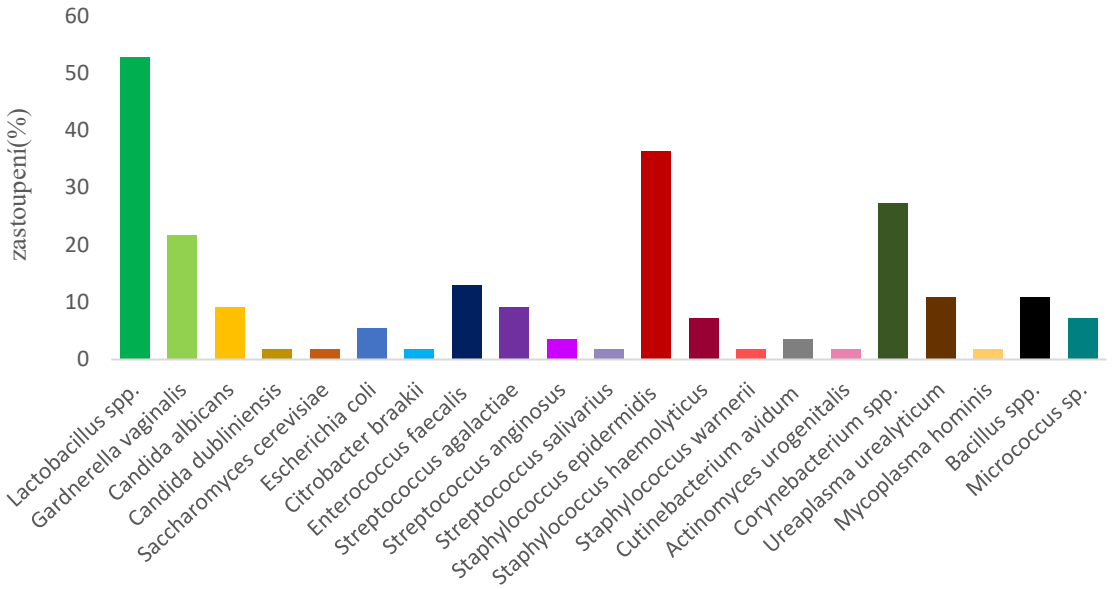
ethidium bromidu. Poté byl gel umístěn do elektroforetické vany a byl do něj zanořen hřebínek pro vytvoření vzorkových jamek. Po zatuhnutí byl gel převrstven TBE pufrem.

Vzorky amplifikovaných produktů byly napipetovány do agarózového gelu o objemu 10 µl. Ke srovnání velikosti fragmentů DNA byl použit DNA marker. Na zdroji pro elektroforézu byly nastaveny podmínky 100 V, 500 mA a 60 minut. Komplex DNA s interkalačním barvivem byl vizualizován v UV transluminátoru a vyhodnocen pomocí software Bio-Capt verze 11.02 (Vilbert Lourmat). DNA izolovaná z referenčních kmenů *M. hominis* PG-21 a *U. urealyticum* 2K-160 byla použita jako pozitivní kontrola.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Celkem bylo odebráno 55 vzorků od 49 pacientek z Centra asistované reprodukce v Pardubicích. Druhy mikroorganismů, které nebylo možné identifikovat pomocí biochemických testů byly diagnostikovány metodou MALDI TOF MS v mikrobiologické laboratoři Medila v Pardubicích. Na potvrzení přítomnosti druhů *U. urealyticum* a *M. hominis* byla použita metoda PCR. Z celkového počtu vzorků bylo vyizolováno 21 druhů mikroorganismů, většina z nich je znázorněna v grafu 3.

Z grafu 3 je patrné, že nejvíce byl zastoupený druh *Lactobacillus* spp. (52,7 %). Dalšími nejvíce zastoupenými druhy byly *Staphylococcus epidermidis* (36,4 %) a *Gardnerella vaginalis* (21,8 %).



Graf 3- Zastoupení jednotlivých druhů mikroorganismů ve vaginální mikroflóře žen podstupujících intrauterinní inseminaci

Výskyt *U. urealyticum* bylo identifikováno u 6 pacientek (12,2 %) a *M. hominis* bylo identifikováno pouze u 1 pacientky (2,04 %). Současně oba mikroorganismy byly přítomné v 1 vzorku pacientky. Vzorky, které byly potvrzeny metodou PCR na *M. hominis* a *U. Urealyticum* byly nejprve detekovány kultivačně.

Výskyt streptokoků skupiny B byl prokázán u 6 pacientek z celkové počtu (12,2 %). Studie Armistead a kol. (2019) uvádí, že celosvětově streptokoky skupiny B kolonizují dolní genitální trakt přibližně u 18 % asymptomatických žen.

Pacientky byly rozděleny do dvou skupin, a to na ty u kterých byla úspěšná inseminace a na pacientky u nichž byla inseminace neúspěšná. Z celkového počtu 49 pacientek otěhotnělo 6 pacientek a 43 pacientek nemělo úspěšnou inseminaci.

V grafu 4 a 5 je znázorněn výskyt mikroorganismů u žen s neúspěšnou a úspěšnou intrauterinní inseminací. Mezi nejčastěji zastoupené druhy u skupiny pacientek s neúspěšnou intrauterinní inseminací patří *Staphylococcus* spp. (60,5 %) a *Lactobacillus* spp. (55,8 %). U pacientek s úspěšnou intrauterinní inseminací se nejvíce vyskytovaly druhy *Lactobacillus* spp., *G. vaginalis*, kvasinky a *Streptococcus* spp. Všechny tyto druhy byly v zastoupení 50 %.

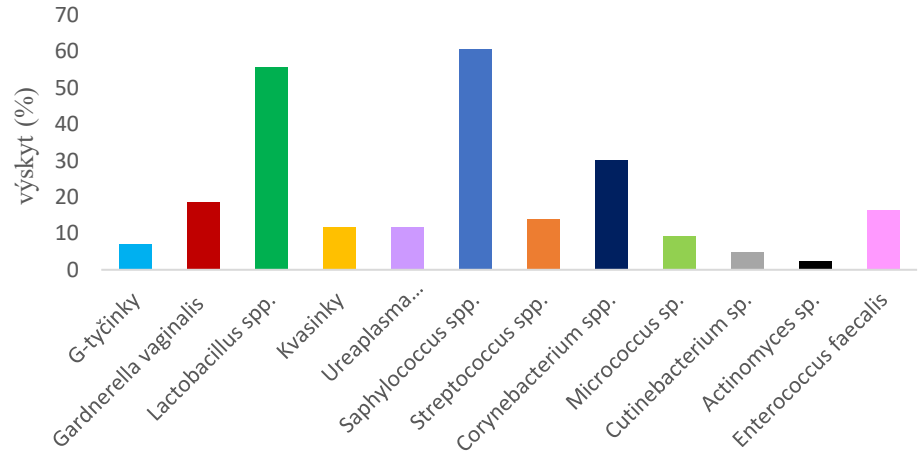
Z grafů 4 je patrné, že u skupiny s neúspěšnou inseminací se vyskytoval druh *Enterococcus faecalis* (16,3 %). I když tento druh nemá přímou souvislost s neplodností, může způsobovat aerobní vaginitidu dle Rampersaund a kol. (2012). Aerobní vaginitida může vést ke komplikacím v těhotenství až k potratu. Ve skupině se nacházely konkrétně 2 pacientky, které prodělaly potrat a vyskytoval se u nich *E. faecalis*.

Rampersaund a kol. (2012) také ve své studii uvádějí, že 20 % žen s AV vykazovalo zvýšený výskyt *G. vaginalis*. Ve skupině pacientek s neúspěšnou intrauterinní inseminací se vyskytoval druh *G. vaginalis* v 18,6 %. Druhy *Gardnerella* spp. a ztráta laktobacilů během bakteriální vaginózy může vést ke komplikacím během těhotenství dle studie Saraf a kol. (2021).

Mezi druhy mikroorganismů, které mohou mít vliv na plodnost a byly prokázány u skupiny s neúspěšnou inseminací patří *E. coli* (6,9 %), *U. urealyticum* (11,6 %) a streptokoky skupiny B (9,3 %). Noh a kol. (2019) ve studii uvádějí, že *U. urealitycum* je čtvrtý nejčastější mikroorganismus ve vaginální flóře. Může zároveň způsobovat komplikace vedoucí k spontánnímu potratu nebo předčasnému porodu.

Ve své studii Seifoleslami a kol. (2015) prokázali, že prevalence *U. urealyticum* a *M. hominis* ve vaginální mikroflóře infertilních žen byla vyšší než u fertilních žen. V této studii odebrali 350 vzorků a z toho 15 bylo pozitivních na *U. urealyticum* (4,28 %). V naší práci bylo ve skupině pacientek s neúspěšnou IUI pozitivních 5 (11,6 %) žen z celkového počtu 43 pacientek.

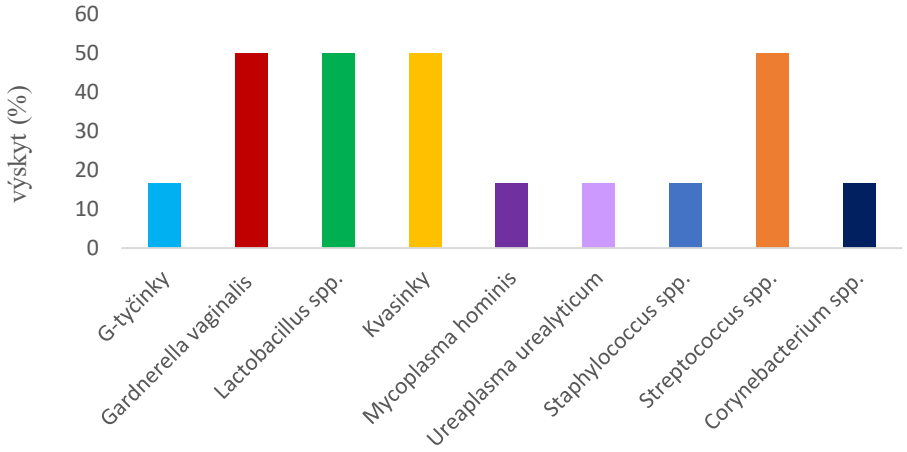
V grafu 4 je patrný vysoký výskyt rodu *Staphylococcus* spp. Stafylokoky jsou přirozenou součástí vaginální mikroflóry žen a nejsou spojovány s neplodností. *S. warnerii* má však vliv na motilitu spermií můžu. V studii Pant a kol. (2019) izolovali *S. warnerii* z děložního krčku ženy, ten následně aglutinoval lidské spermie *in vitro*. V naší práci byla pozitivně testována na *S. warnerii* jedna pacientka, u které byl výsledek neúspěšné IUI.



Graf 4- Výskyt mikroorganismů u žen s neúspěšnou intrauterinní inseminací

Legenda: G-tyčinky – *Escherichia coli*, *Citrobacter braakii*

Kvasinky – *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Saccharomyces cerevisiae*



Graf 5- Výskyt mikroorganismů u žen s úspěšnou intrauterinní inseminací

Legenda: G-tyčinky – *Escherichia coli*, *Citrobacter braakii*

Kvasinky – *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Saccharomyces cerevisiae*

V grafu 6 jsou znázorněny věkové kategorie pacientek, které podstoupily IUI a výskyt mikroorganismů, které mají vztah k neplodnosti. U všech věkových kategorií se vyskytovaly laktobacily.

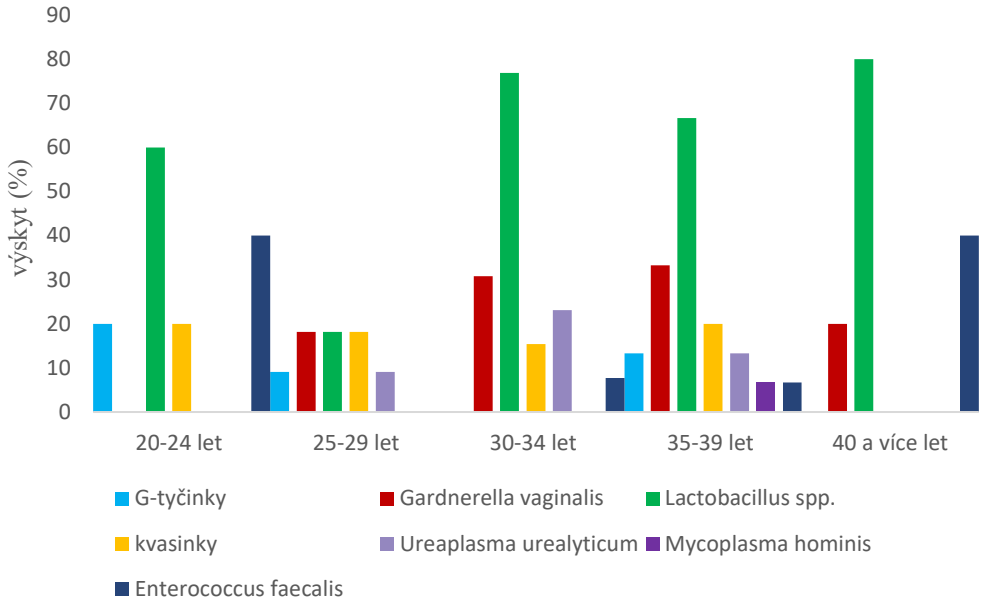
Vitale a kol. (2022) ve své studii naznačili, že nedostatek vaginální flóry s převahou laktobacilů ve vaginální mikroflóře lze považovat za novou příčinu selhání implantace embrya a ztráty těhotenství. Studie popisuje důležitost laktobacilů ve vaginální flóře a jejich hladin. Pokud nastane ovlivnění těchto hladin vede to k potenciálním faktorům, které zhoršují plodnost. Příkladem je *L. crispatus* a jeho hladina, která je ochranným faktorem pro asymptomatickou bakteriální vaginózu. Tato dysbióza je uznávána jako potenciální faktor, který má vliv na plodnost ženy.

Vitale a kol. (2022) dále uvádějí, že dysbióza a nedostatek laktobacilů mohou potenciálně narušit asistovanou reprodukci a částečně vysvětlit její selhání.

Ve věkové kategorii 20-24 let se vykytovaly častěji G-tyčinky (20 %) oproti ostatním věkovým kategoriím. V kategorii 40 a více let byl výskyt *E. faecalis* (40 %) vyšší než v ostatních kategoriích. U žen ve věkové kategorii 35-39 let se vyskytovaly *U. urealyticum* (13,3 %) a *M. homnis* (6,7 %).

Dle Margarita a kol. (2020) *M. hominis* lze nalézt u zdravých i symptomatických žen, jeho přítomnost je spojena se změnami vaginální flóry, včetně bakteriální vaginózy. Smaoui a kol. (2019) ve studii uvádí, že *M. hominis* bylo také vyizolováno u žen s potratem.

Kvasinky, které jsou zastoupeny ve všech věkových kategorií kromě kategorie 40 a více let mohou v případě nerovnováhy vaginálního prostředí vést k vulvovaginální kandidóze. Dle He a kol. (2020) stavy dysbiózy mezi které patří i vulvovaginální vaginóza mají spojitost s neplodností žen.

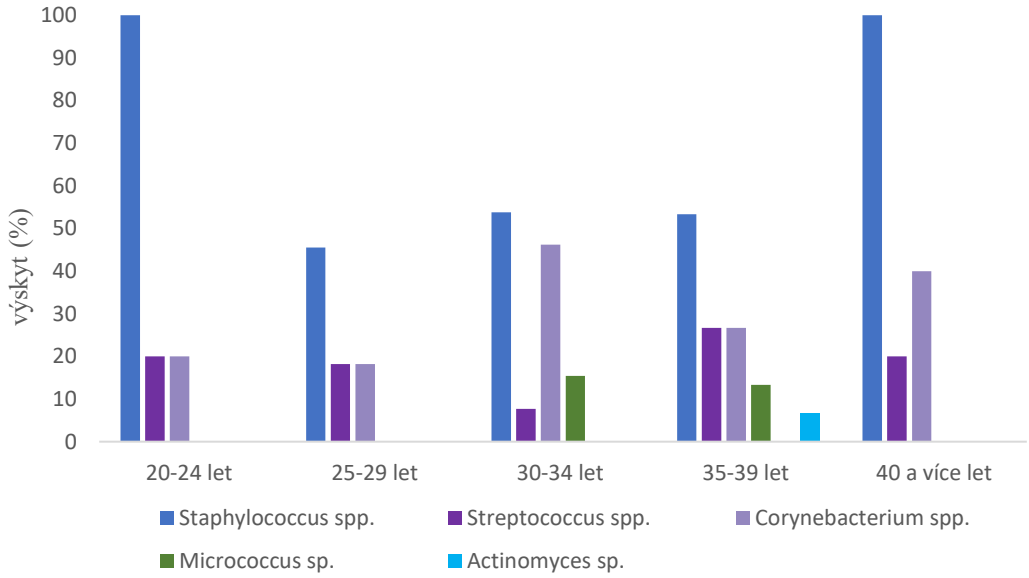


Graf 6- Výskyt mikrobiálních druhů se vztahem k neplodnosti v závislosti na věku ženy

Legenda: G-tyčinky – *Escherichia coli*, *Citrobacter braakii*

Kvasinky – *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Saccharomyces cerevisiae*

Graf 7 znázorňuje výskyt mikroorganismů, které nemají přímý vliv na plodnost ženy. Nejčastěji je ve všech věkových kategoriích zastoupen druh *Staphylococcus* spp. a *Corynebacterium* spp.



Graf 7- Výskyt mikrobiálních druhů v závislosti na věku ženy

Pacientky měly různé diagnózy k provedení IUI. Jednotlivé diagnózy a počet pacientek s danou diagnózou jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4- Seznam indikací pro intrauterinní inseminaci

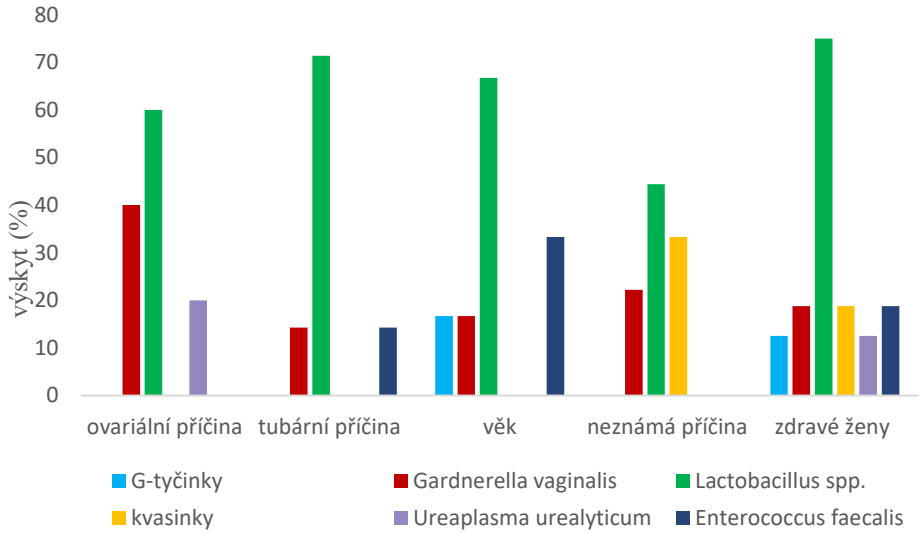
Indikace IUI	Počet
ovariální příčina	5
tubární příčina	7
polycystická ovaria	2
cervikální příčina	1
myomatóza	1
přeléčená mykoplasmová infekce	1
endometrióza	1
Ashemarnův syndrom	1
věk	6
imunologický faktor	2
neznámá příčina	9
potrat	2
umělé přerušení	1
andrologický problém (partner)	16
nepravidelné cykly	2

Na základě nejčastěji se vyskytujících diagnóz jsou v grafu 8 znázorněny skupiny pacientek a uvedeny mikroorganismy, které mají vliv na plodnost ženy.

Nejrozsáhlejší skupinou byl andrologický problém, který souvisí se spermiogramem mužů. Ženy v této skupině lze z pohledu plodnosti považovat za zdravé.

Skupině s neznámou příčinou dominují kvasinky (33,3 %). Brown a kol. (2020) se zabývali skupinou netěhotných žen v reprodukčním věku. U 21 % bylo detekována *C. albicans* a z toho 46 % žen hlásilo vaginální příznaky v předchozích 60 dnech. Tyto příznaky mohou vést ke kandidóze, která má vliv na plodnost ženy.

E. faecalis byl prokázán ve skupinách, kde byla indikace z tubární příčiny (14,3 %) a věku (33,3 %). Z grafu je však patrné, že se vyskytuje i u zdravých žen (18,8 %).

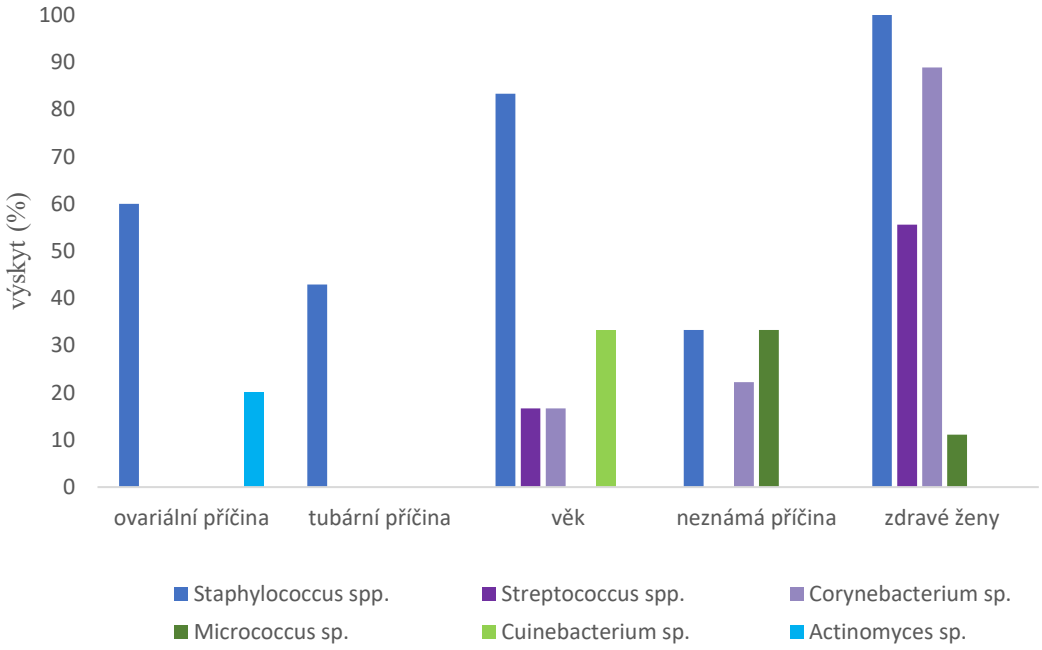


Graf 8- Výskyt mikrobiálních druhů se vztahem k neplodnosti v závislosti na diagnóze

Legenda: G-tyčinky – *Escherichia coli*, *Citrobacter braakii*

Kvasinky – *Candida albicans, Candida dubliniensis*, *Saccharomyces cerevisiae*

Zdravé ženy – skupina žen bez projevů onemocnění, které podstupují IUI z důvodu andrologického problému partnera



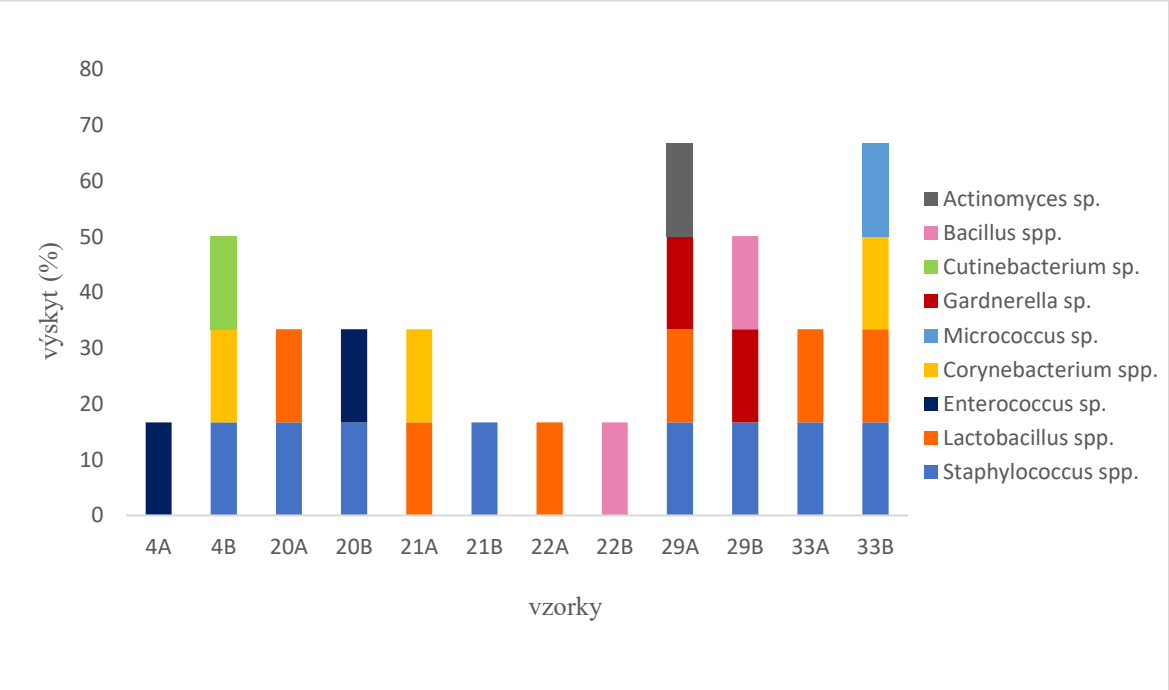
Graf 9- Výskyt mikrobiálních druhů v závislosti na diagnóze

Legenda: Zdravé ženy skupina žen bez projevů onemocnění, které podstupují IUI z důvodu andrologického problému partnera

Graf 9 znázorňuje mikroorganismy, které nemají přímý vliv na plodnost žen v jednotlivých skupinách diagnóz. Zajímavostí je, že ve skupině zdravých žen, kdy problém má s plodností partner je právě zvýšená četnost druhu *Staphylococcus spp*. (100 %) Již výše zmiňovaný *S. warnerii* má vliv na plodnost muže.

Opakovaný odběr byl proveden u 6 pacientek. Graf 10 znázorňuje výskyt jednotlivých druhů mikroorganismů a jejich odlišnost při prvním a druhém odběru. Je patrné, že opakovaný odběr není nikdy totožný. Nález je u odběrů proměnlivý a pacientka může mít přítomný mikroorganismus, který nemusí ovlivňovat její plodnost, ale naopak partnera. Pant a kol. (2019) prokázali, že *Enterococcus* sp. má vliv na motilitu spermií u muže.

Taktéž záleží na stavu pacientky, ve kterém přichází na podstoupení IUI. Některé dysbózy, které jsou v počátku nemusí být odhaleny klinickými příznaky a následně pak patogen způsobí neúspěšnou IUI. *G. vaginalis* může být součástí přirozené mikroflóry a dle Chen a kol. (2021) a Alfraji a kol. (2020) sama osobě nemusí ihned způsobit BV. Jsou k tomu potřebné faktory jako snížený výskyt laktobacilů a změna pH vaginy.



Graf 10- Výskyt mikroorganismů ve vzorcích u dvakrát vyšetřených žen

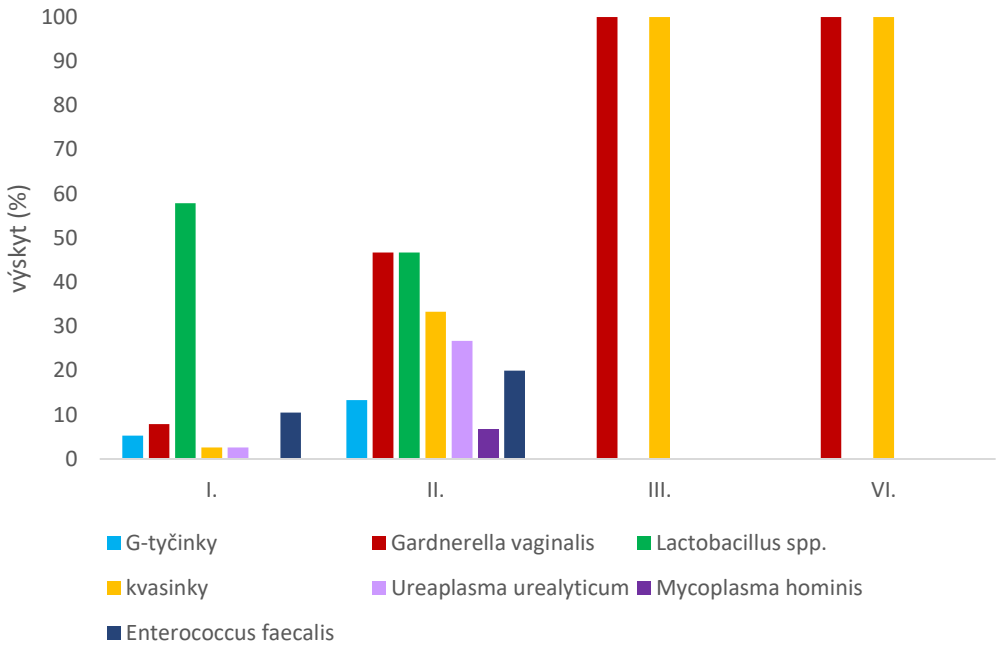
Po vyhodnocení mikrobiálního poševního obrazu (MOP) u jednotlivých vzorků byly zařazeny do klasifikovaných šesti skupin. Graf 11 znázorňuje skupiny I., II., III. a VI. Každá skupina je charakterizována podle nálezu v mikroskopickém obrazu. Skupina I. zahrnuje zdravé ženy; II. bakteriální vaginózu nebo mikrobiální nehnisavý výtok; III. bakteriální hnisavý výtok a VI. vaginální kandidózu.

V MOPu I. je typicky převaha laktobacilů, což je v grafu znázorněno výskytem 57,9 % laktobacilů.

V MOPu II. se nachází množství bakterií a to nejčastěji *G. vaginalis*. V porovnání s MOPem I. je patrné zvýšený výskyt *G. vaginalis* (46,7 %) u MOPu II. *G. vaginalis* má adhezi k buňkám vaginálního epitelu viz příloha F. V mikrobiálním poševním obrazu byly přítomny také shluky *G. vaginalis* viz příloha E.

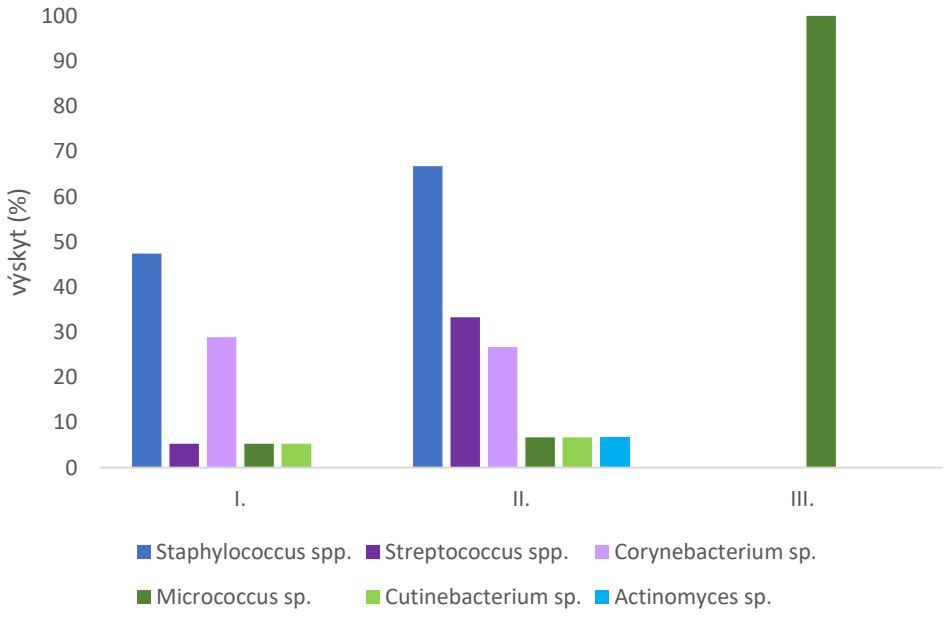
MOP III. je charakteristický velkým množství polymorfonukleárů a bakterií. Také je zde absence laktobacilů, která je patrná i z grafu. Vyskytovala se zde právě *G. vaginalis* (100 %), která je nejčastěji spojována právě s bakteriální vaginózou. I když je bakteriální vaginóza typická pro MOP II., tento vzorek byl zařazen do skupiny MOP III. z důvodu mikroskopického prokázání záplavy leukocytů viz příloha H. Dále u vzorku pacientky byla prokázána *S. cerevisiae* (100 %). V mikrobiálním poševním obrazu byla přítomna pučící balstokonidie viz příloha G. Přítomnost kvasinek je charakteristická pro MOP IV. V případě tohoto vzorku se jedná o kombinaci bakteriální vaginózy a kandidózy.

MOP VI. se vyznačuje přítomností kvasinek, laktobacilů a dalších bakterií. Přítomnost kvasinek je znázorněna v grafu 11. Současně je zde výskyt *G. vaginalis* jako u vzorku řazeného k MOP III. Přítomnost kvasinek je charakteristická pro MOP VI, protože se vyznačuje tento nález vaginální kandidózou. Tato dysbióza jak již bylo výše zmíněno má souvislost s vlivy na plodnost ženy. Na rozdíl od skupiny MOP III. se ta to skupina nevyznačuje velkou přítomností leukocytů. Nemusejí být vůbec přítomné. U vzorku z této skupiny bylo možné pozorovat leukocyty, a právě blastokonidie kvasinek viz příloha I. U vzorku s MOP IV. prokázána *C. dubliniensis.*



Graf 11- Výskyt mikrobiálních druhů se vztahem k neplodnosti v závislosti na mikrobiálním poševním obrazu

V grafu 12 jsou znázorněné mikroorganismy, které nejsou přímo spojovány s neplodností žen. Je ale patrné že ve skupině MOP II. je častý výskyt *Staphylococcus* spp. (66,7 %) a *Streptococcus* spp. (33,3 %). Oba ty to druhy jsou převážně nepatologickou součástí mikroflóry.



Graf 12- Výskyt mikrobiálních druhů v závislosti na mikrobiálním poševním obrazu

5 ZÁVĚR

Mikroflóra genitálního ústrojí žen hraje významnou roli ve zdraví ženy. V popředí této mikrobiální populace stojí laktobacily, které jsou zodpovědné za udržování nízkého pH prostředí, čímž regulují přemnožení ostatní mikroorganismů. Přítomnost laktobacilů má významný vliv na zastoupení jednotlivých druhů mikroorganismů. Zvýšený výskyt potenciálně patogenních druhů, jakými jsou *G. vaginalis, U. urealyticum, M. hominis* a dalších, může vést nejenom ke vzniku bakteriální vaginózy, ale taktéž ovlivnit plodnost ženy.

Cílem práce bylo vyšetřit zastoupení jednotlivých mikroorganismů ve vzorcích odebraných z genitálního ústrojí žen podstupujících intrauterinní inseminaci. Celkem bylo vyšetřeno 55 vzorků od 49 žen. Mikrobiální druhy byly identifikovány podle morfologie a uspořádání bakteriálních buněk, morfologie kolonií, antigenních a biochemických vlastností. Druhy, které nebylo možné na základě těchto vlastností určit nebo vykazovaly netypické vlastnosti byly zařazeny do druhu metodou MALDI TOF MS. Druhy *M. hominis a U. urealyticum* byly prokazovány kultivačními metodami a následně potvrzeny metodou PCR. Celkem bylo ve vzorcích prokázáno 21 druhů mikroorganismů. Nejčastěji se jednalo o druhy *Lactobacillus* spp. (52,7 %), *Staphylococcus epidermidis* (36,4 %) a *Gardnerella vaginalis* (21,8 %). *U. urealyticum* bylo identifikováno u 6 pacientek (12,2 %) a *M. hominis* bylo identifikováno pouze u 1 pacientky (2,04 %). Současně oba mikroorganismy byly přítomné v 1 vzorku pacientky. Výskyt streptokoků skupiny B byl prokázán u 6 pacientek (12,2 %).

Plodnost žen je ovlivněna velkým množstvím faktorů mezi ně můžeme řadit i mikrobiální nález z poševní sliznice. Je možné že kombinace diagnózy a prokázání patogenního mikroorganismu může značně ovlivnit plodnost. Z celkového počtu otěhotnělo 6 žen. Mezi nejčastěji zastoupené druhy u skupiny pacientek s neúspěšnou intrauterinní inseminací patřil *Staphylococcus* spp. (60,5 %) a *Lactobacillus* spp. (55,8 %). U pacientek s úspěšnou intrauterinní inseminací se nejvíce vyskytovaly druhy *Lactobacillus* spp., *G. vaginalis*, kvasinky a *Streptococcus* spp. Všechny druhy byly v zastoupení 50 %. Druh *Enterococcus faecalis* se u skupiny pacientek s neúspěšnou intrauterinní inseminací vyskytoval v zastoupení 16,3 %. U dvou pacientek, které v minulosti prodělaly potrat byl *E. faecalis* prokázán.

Vzhledem k tomu, že pacientky musí intrauterinní inseminaci podstoupit během ovulace je počet vzorků ovlivněn tímto faktorem. Kdybych v této práci pokračovala navrhla bych setrvat

v odběru vzorků od pacientek a tím rozšířit výchozí výsledky. Zaměřila bych se na patogenní mikroorganismy, které jsou spojovány s neplodností. Dále bych navrhovala do práce zahrnout vyšetření spermatu od mužů z páru. V práci by taktéž mohla být zahrnuta porovnávací skupina žen, které jsou zdravé a neléčí se s neplodností.

6 LITERÁRNÍ ZDROJE

[1] ABRANCHES, J., L. ZENG, J. K. KAJFASZ, et al. Biology of Oral Streptococci. *Microbiology Spectrum* [online]. 2018, **6**(5) [cit. 2022-03-30]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018

[2] AGATENSI, L, F FRANCHI, F MONDELLO, R L BEVILACQUA, T CEDDIA, F DE BERNARDIS a A CASSONE. Vaginopathic and proteolytic Candida species in outpatients attending a gynaecology clinic. *Journal of Clinical Pathology* [online]. 1991, **44**(10), 826-830 [cit. 2022-01-10]. ISSN 0021-9746. Dostupné z: doi:10.1136/jcp.44.10.826

[3] ACHERMANN, Yvonne, Jared LIU, Reinhard ZBINDEN, et al. Propionibacterium avidum: A Virulent Pathogen Causing Hip Periprosthetic Joint Infection. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2018, **66**(1), 54-63 [cit. 2022-01-12]. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1093/cid/cix665

[4] ALFRAJI, Nasam, Steven DOUEDI, Arda AKOLUK, Jaraad DATTADEEN, Lito FUNE a Edward LIU. Gardnerella vaginalis bacteremia in an elderly healthy male. *IDCases* [online]. 2020, **21** [cit. 2022-01-10]. ISSN 22142509. Dostupné z: doi:10.1016/j.idcr.2020.e00807

[5] ARENA, Bruno, Maria Diletta a DACCÒ. Evaluation of vaginal microbiota in women admitted to the hospital for premature labour. *Acta Biomed* [online]. 2021, **92**(5), 1-6 [cit. 2022-04-29]. Dostupné z: doi:10.23750/abm.v92i5.9925

[6] ARMISTEAD, Blair, Elizabeth OLER, Kristina ADAMS WALDORF a Lakshmi RAJAGOPAL. The Double Life of Group B Streptococcus: Asymptomatic Colonizer and Potent Pathogen. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2019, **431**(16), 2914-2931 [cit. 2022-04-02]. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2019.01.035

[7] ARMISTEAD, Blair, Elizabeth OLER, Kristina ADAMS WALDORF a Lakshmi RAJAGOPAL. The Double Life of Group B Streptococcus: Asymptomatic Colonizer and Potent Pathogen. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2019, **431**(16), 2914-2931 [cit. 2022-04-03]. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2019.01.035

[8] ARYA, O P. Is Mycoplasma hominis a vaginal pathogen?. *Sexually Transmitted Infections* [online]. **77**(1), 58-62 [cit. 2022-04-30]. ISSN 13684973. Dostupné z: doi:10.1136/sti.77.1.58

[9] ASADZADEH, Mohammad, Suhail AHMAD, Noura AL-SWEIH a Ziauddin KHAN. Rapid and Accurate Identification of Candida albicans and Candida dubliniensis by Real-Time PCR and Melting Curve Analysis. *Medical Principles and Practice* [online]. 2019, **27**(6), 543-548 [cit. 2022-03-05]. ISSN 1011-7571. Dostupné z: doi:10.1159/000493426

[10] BAROUSSE, M. Vaginal yeast colonisation, prevalence of vaginitis, and associated local immunity in adolescents. *Sexually Transmitted Infections* [online]. 2004, **80**(1), 48-53 [cit. 2022-04-27]. ISSN 1368-4973. Dostupné z: doi:10.1136/sti.2002.003855

[11] BEGHINI, J, IM LINHARES, PC GIRALDO, WJ LEDGER a SS WITKIN. Differential expression of lactic acid isomers, extracellular matrix metalloproteinase inducer, and matrix metalloproteinase-8 in vaginal fluid from women with vaginal disorders. *BJOG - An International Journal of Obsterics and Gynaecology* [online]. 2015, **122**(12), 1580-1585 [cit. 2022-04-28]. ISSN 14700328. Dostupné z: doi:10.1111/1471-0528.13072

[12] BEN BRAÏEK, Olfa a Slim SMAOUI. Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *BioMed Research International* [online]. 2019, **2019**, 1-13 [cit. 2022-04-10]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2019/5938210

[13] 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. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 1993. **17**, 148-153 [cit. 200-04-33]

[14] BLANCHARD, A., YÁÑEZ A., DYBVIG, K., WATSON, H. L., GRIFFITHS, G., CASSELL, G. H. Evaluation of Intraspecies Genetic Variation within the 16S rRNA Gene of *Mycoplasma hominis* and Detection by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 1993, **31**(5), 1358-1361 [cit. 2022-04-30].

[15] BRANNON, John R., Taryn L. DUNIGAN, Connor J. BEEBOUT, Tamia ROSS, Michelle A. WIEBE, William S. REYNOLDS a Maria HADJIFRANGISKOU. Invasion of vaginal epithelial cells by uropathogenic Escherichia coli. *Nature Communications* [online]. 2020, **11**(1) [cit. 2022-03-01]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-020-16627-5

[16] BROWN, Sarah E., Jennifer A. SCHWARTZ, Courtney K. ROBINSON, et al. The Vaginal Microbiota and Behavioral Factors Associated With Genital Candida albicans Detection in Reproductive-Age Women. *Sexually Transmitted Diseases* [online]. 2019, **46**(11), 753-758 [cit. 2022-04-30]. ISSN 1537-4521. Dostupné z: doi:10.1097/OLQ.0000000000001066

[17] COATES-BROWN, Rosanna a Malcolm J. HORSBURGH. Whole-Genome Sequence of Staphylococcus hominis Strain J31 Isolated from Healthy Human Skin. *Genome Announcements* [online]. 2017, **5**(15), e01548-16 [cit. 2022-03-21]. ISSN 2169-8287. Dostupné z: doi:10.1128/genomeA.01548-16

[18] CORVEC, Stéphane. Clinical and Biological Features of Cutibacterium (Formerly Propionibacterium) avidum , an Underrecognized Microorganism. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2018, **31**(3), e00064-17 [cit. 2022-02-13]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00064-17

[19] DABEE, Smritee, Jo-Ann S. PASSMORE, Renee HEFFRON, Heather B. JASPAN a Anthony R. RICHARDSON. The Complex Link between the Female Genital Microbiota, Genital Infections, and Inflammation. *Infection and Immunity* [online]. 2021, **89**(5), e00487-20 [cit. 2022-03-12]. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.00487-20

[20] DEITZLER, Grace E., Maria J. RUIZ, Wendy LU, et al. Genome Sequences of Nine Gram-Negative Vaginal Bacterial Isolates. *Genome Announcements* [online]. 2016, **4**(5), e00889-16 [cit. 2022-03-01]. ISSN 2169-8287. Dostupné z: doi:10.1128/genomeA.00889-16

[21] DONDERS, Gilbert G.G., Eugene BOSMANS, Alfons DEKEERSMAECKERB, Annie VEREECKEN, Ben VAN BULCK a Bernard SPITZ. Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [online]. 2000, **182**(4), 872-878 [cit. 2022-04-29]. ISSN 00029378. Dostupné z: doi:10.1016/S0002-9378(00)70338-3

[22] EBRAHIMZADEH NAMVAR, Amirmorteza, Niloufar ABBASI, Ghazaleh SHEIKHI GHEHI, et al. Clinical characteristics of Staphylococcus epidermidis: a systematic review. *GMS Hyg Infect Control* [online]. 2014, **9**(3), 1-10 [cit. 2022-03-20].

[23] ELSAYED, S., A. GEORGE a K. ZHANG. Intrauterine contraceptive device-associated pelvic actinomycosis caused by Actinomyces urogenitalis. *Anaerobe* [online]. 2006, **12**(2), 67-70 [cit. 2022-04-30]. ISSN 10759964. Dostupné z: doi:10.1016/j.anaerobe.2005.12.004

[24] ELTWISY, Hala O., Medhat ABDEL-FATTAH, Amani M. ELSISI, Mahmoud M. OMAR, Ahmed Aly ABDELMOTELEB a Mohamed A. EL-MOKHTAR. Pathogenesis of Staphylococcus haemolyticus on primary human skin fibroblast cells. *Virulence* [online]. 2020, **11**(1), 1142-1157 [cit. 2022-03-26]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.1080/21505594.2020.1809962

[25] ESKANDAR, Samantha, Taylor MILLER-ENSMINGER, Adelina VOUKADINOVA, Alan J. WOLFE, Catherine PUTONTI a David RASKO. Draft Genome Sequence of Corynebacterium aurimucosum UMB7769, Isolated from the Female Urinary Tract. *Microbiology Resource*

Announcements [online]. 2020, **9**(22), e00391-20 [cit. 2022-02-25]. ISSN 2576-098X. Dostupné z: doi:10.1128/MRA.00391-20

[26] FERNANDEZ, Laura V., Ana S. FORTUNY a Ernesto F. RODRIGUEZ. Mastitis por Corynebacterium pyruviciproducens y Corynebacterium amycolatum en mujeres inmunocompetentes no lactantes. *Revista Argentina de Microbiología* [online]. 2021, **53**(1), 39-42 [cit. 2022-04-10]. ISSN 03257541. Dostupné z: doi:10.1016/j.ram.2020.06.006

[27] FRANK, Kristi L., José Luis DEL POZO a Robin PATEL. From Clinical Microbiology to Infection Pathogenesis: How Daring To Be Different Works for Staphylococcus lugdunensis. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2008, **21**(1), 111-133 [cit. 2022-03-21]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00036-07

[28] GLADYSHEVA, Irina V., Sergey V. CHERKASOV, Yuriy A. KHLOPKO a Andrey O. PLOTNIKOV. Genome Characterization and Probiotic Potential of Corynebacterium amycolatum Human Vaginal Isolates. *Microorganisms* [online]. 2022, **10**(2) [cit. 2022-02-20]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms10020249

[29] GLADYSHEVA, Irina V., Sergey V. CHERKASOV, Yuriy A. KHLOPKO, Andrey O. PLOTNIKOV a Natalya E. GOGOLEVA. Draft Genome Sequence of Corynebacterium amycolatum Strain ICIS 53 Isolated from a Female Urogenital Tract. *Genome Announcements* [online]. 2016, **4**(6), e01267-16 [cit. 2022-02-20]. ISSN 2169-8287. Dostupné z: doi:10.1128/genomeA.01267-16

[30] GLADYSHEVA, Irina V., Yuriy A. KHLOPKO a Sergey V. CHERKASOV. Draft Genome Sequence of the Vaginal Isolate Corynebacterium amycolatum ICIS 9. *Genome Announcements* [online]. 2017, **5**(37), e00975-17 [cit. 2022-04-10]. ISSN 2169-8287. Dostupné z: doi:10.1128/genomeA.00975-17

[31] GOLDSTEIN, Ellie J. C., Kerin L. TYRRELL a Diane M. CITRON. Lactobacillus Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2015, **60**(suppl_2), S98-S107 [cit. 2021-12-10]. ISSN 1537-6591. Dostupné z: doi:10.1093/cid/civ072

[32] GUO, Yinjuan, Yu DING, Li LIU, et al. Antimicrobial susceptibility, virulence determinants profiles and molecular characteristics of Staphylococcus epidermidis isolates in Wenzhou, eastern China. *BMC Microbiology* [online]. 2019, **19**(1) [cit. 2022-03-20]. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/s12866-019-1523-6

[33] HE, Yuanhui, Xiaoxi NIU, Ben WANG, Risu NA, Bingbing XIAO a Huixia YANG. Evaluation of the Inhibitory Effects of Lactobacillus gasseri and Lactobacillus crispatus on the Adhesion of Seven Common Lower Genital Tract Infection-Causing Pathogens to Vaginal Epithelial Cells. *Frontiers in Medicine* [online]. 2020, **7**(284) [cit. 2022-03-12]. ISSN 2296-858X. Dostupné z: doi:10.3389/fmed.2020.00284

[34] HEILBRONNER, Simon a Timothy J. FOSTER. Staphylococcus lugdunensis: a Skin Commensal with Invasive Pathogenic Potential. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2021, **34**(2), e00205-20 [cit. 2022-03-21]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00205-20

[35] HEROVEN, Ann Kathrin, Aaron M. NUSS a Petra DERSCH. RNA-based mechanisms of virulence control in Enterobacteriaceae. *RNA Biology* [online]. 2017, **14**(5), 471-487 [cit. 2022-04-25]. ISSN 1547-6286. Dostupné z: doi:10.1080/15476286.2016.1201617

[36] HESHAM, Helai, Alissa J. MITCHELL, Agnes BERGERAT, Kristin HUNG a Caroline M. MITCHELL. Impact of vaginal douching products on vaginal Lactobacillus, Escherichia coli and epithelial immune responses. *Scientific Reports* [online]. 2021, **11**(1) [cit. 2022-03-01]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-02426-5

[37] 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. 2022-03-08]. ISSN 02722712. Dostupné z: doi:10.1016/j.cll.2014.08.006

[38] HUANG, C., H.L. ZHU, K.R. XU, S.Y. WANG, L.Q. FAN a W.B. ZHU. Mycoplasma and ureaplasma infection and male infertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology* [online]. 2015, **3**(5), 809-816 [cit. 2022-04-30]. ISSN 20472919. Dostupné z: doi:10.1111/andr.12078

[39] CHEE, Wallace Jeng Yang, Shu Yih CHEW a Leslie Thian Lung THAN. Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health. *Microbial Cell Factories* [online]. 2020, **19**(1) [cit. 2021-12-20]. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-020-01464-4

[40] CHEN, Xiaodi, Yune LU, Tao CHEN a Rongguo LI. The Female Vaginal Microbiome in Health and Bacterial Vaginosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2021, **11** [cit. 2021-12-20]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2021.631972

[41] JAN, Abiroo, Gulnaz BASHIR, Insha ALTAF, Bashir A. FOMDA, Sabiya HAMID a Kownsar JAN. Evaluation of various phenotypic methods for differentiation of Candida dubliniensis from Candida albicans. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2022, **193** [cit. 2022-03-05]. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2021.106400

[42] JIANG, S., B. ZHENG, W. DING, L. LV, J. JI, H. ZHANG, Y. XIAO a L. LI. Whole-Genome Sequence of Staphylococcus hominis, an Opportunistic Pathogen. *Journal of Bacteriology* [online]. 2012, **194**(17), 4761-4762 [cit. 2022-03-21]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.00991-12

[43] KAAMBO, Evelyn, Charlene AFRICA, Ramadhani CHAMBUSO a Jo-Ann Shelley PASSMORE. Vaginal Microbiomes Associated With Aerobic Vaginitis and Bacterial Vaginosis. *Frontiers in Public Health* [online]. 2018, **6**(78) [cit. 2022-03-15]. ISSN 2296-2565. Dostupné z: doi:10.3389/fpubh.2018.00078

[44] KALIA, Namarta, Jatinder SINGH a Manpreet KAUR. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* [online]. 2020, **19**(1) [cit. 2021-12-04]. ISSN 1476-0711. Dostupné z: doi:10.1186/s12941-020-0347-4

[45] KRAWCZYK, Beata, Paweł WITYK, Mirosława GAŁĘCKA a Michał MICHALIK. The Many Faces of Enterococcus spp.—Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(9) [cit. 2022-03-02]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9091900

[46] LAI, Samuel K., Kaoru HIDA, Shetha SHUKAIR, Ying-Ying WANG, Anna FIGUEIREDO, Richard CONE, Thomas J. HOPE a Justin HANES. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Trapped by Acidic but Not by Neutralized Human Cervicovaginal Mucus. *Journal of Virology* [online]. 2009, **83**(21), 11196-11200 [cit. 2022-04-29]. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.01899-08

[47] LAMONT, RF, JD SOBEL, RA AKINS, SS HASSAN, T CHAIWORAPONGSA, JP KUSANOVIC a R ROMERO. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG - An International Journal of Obsterics and Gynaecology* [online]. 2011, **118**(5), 533-549 [cit. 2022-03-10]. ISSN 14700328. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-0528.2010.02840.x

[48] LI, Dan, Xin-Zuo CHI, Lei ZHANG, Rui CHEN, Jing-rong CAO, Xiao-yan SUN, He-qin YANG a Qin-ping LIAO. Vaginal microbiome analysis of healthy women during different periods of gestation. *Bioscience Reports* [online]. 2020, **40**(7) [cit. 2021-12-10]. ISSN 0144-8463. Dostupné z: doi:10.1042/BSR20201766

[49] MA, Xiaotong, Ming WU, Chen WANG, Huiyang LI, Aiping FAN, Yingmei WANG, Cha HAN a Fengxia XUE. The pathogenesis of prevalent aerobic bacteria in aerobic vaginitis and adverse pregnancy outcomes: a narrative review. *Reproductive Health* [online]. 2022, **19**(1) [cit. 2022-03-03]. ISSN 1742-4755. Dostupné z: doi:10.1186/s12978-021-01292-8

[50] MANIA-PRAMANIK, J, S C KERKAR a V S SALVI. Bacterial vaginosis: a cause of infertility? *Int J STD AIDS* [online]. 2009, **20**(11), 778-781 [cit. 2022-04-27]. ISSN 0956-4624. Dostupné z: doi:10.1258/ijsa.2009.009193

[51] MARGARITA, Valentina, Pier Luigi FIORI a Paola RAPPELLI. Impact of Symbiosis Between Trichomonas vaginalis and Mycoplasma hominis on Vaginal Dysbiosis: A Mini Review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2020, **10** [cit. 2022-04-30]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2020.00179

[52] MARTÍNEZ, María A a Alfredo OVALLE. Actinomyces urogenitalis. *Revista chilena de infectología* [online]. 2011, **28**(4), 357-358 [cit. 2022-02-14]. ISSN 0716-1018. Dostupné z: doi:10.4067/S0716-10182011000500009

[53] MCCULLOUGH, Michael J., Karl V. CLEMONS, Claudio FARINA, John H. MCCUSKER a David A. STEVENS. Epidemiological Investigation of Vaginal Saccharomyces cerevisiae Isolates by a Genotypic Method. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 1998, **36**(2), 557-562 [cit. 2022-01-11]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.36.2.557-562.1998

[54] MEREDITH, Travis A. a J. Niklas ULRICH. Infectious Endophthalmitis. *Retina* [online]. Elsevier, 2013, 2013, 2019-2039 [cit. 2022-01-12]. ISBN 9781455707379. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4557-0737-9.00122-3

[55] MICHOU, I. Vassiliki, Pantelis CONSTANTOULAKIS, Kostantinos MAKAROUNIS, Giorgos GEORGOULIAS, Vassilis KAPETANIOS a Vassilis TSILIVAKOS. Molecular investigation of menstrual tissue for the presence of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis collected by women with a history of infertility. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* [online]. 2014, **40**(1), 237-242 [cit. 2022-04-30]. ISSN 13418076. Dostupné z: doi:10.1111/jog.12165

[56] MÖLLMANN, Sabrina, Andreas ALBERSMEIER, Christian RÜCKERT a Andreas TAUCH. Complete Genome Sequence of Corynebacterium imitans DSM 44264, Isolated from a Five-Month-Old Boy with Suspected Pharyngeal Diphtheria. *Genome Announcements* [online]. 2014, **2**(6), e01210-14 [cit. 2022-03-28]. ISSN 2169-8287. Dostupné z: doi:10.1128/genomeA.01210-14

[57] MONGA, MANOJ a Dr. JAMES A. ROBERTS. Spermagglutination by Bacteria: Receptor-Specific Interactions. *Journal od Andrology* [online]. 1994, **15**(2), 151-156 [cit. 2022-04-29]. Dostupné z: doi:10.1002/j.1939-4640.1994.tb00423.x

[58] MORENO, Inmaculada a Carlos SIMON. Relevance of assessing the uterine microbiota in infertility. *Fertility and Sterility* [online]. 2018, **110**(3), 337-343 [cit. 2022-04-10]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/j.fertnstert.2018.04.041

[59] NIU, Xiao-Xi, Ting LI, Xu ZHANG, Su-Xia WANG a Zhao-Hui LIU. Lactobacillus crispatus Modulates Vaginal Epithelial Cell Innate Response to Candida albicans. *Chinese Medical Journal* [online]. 2017, **130**(3), 273-279 [cit. 2022-04-29]. ISSN 0366-6999. Dostupné z: doi:10.4103/0366-6999.198927

[60] NOH, Eui Jeong, Dong Jae KIM, Jun Young LEE, et al. Ureaplasma Urealyticum Infection Contributes to the Development of Pelvic Endometriosis Through Toll-Like Receptor 2. *Frontiers in Immunology* [online]. 2019, **10** [cit. 2022-04-30]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.02373

[61] PAIN, Maria, Runa WOLDEN, Daniel JAÉN-LUCHORO, Francisco SALVÀ-SERRA, Beatriz Piñeiro IGLESIAS, Roger KARLSSON, Claus KLINGENBERG a Jorunn Pauline

CAVANAGH. Staphylococcus borealis sp. nov., isolated from human skin and blood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2020, **70**(12), 6067-6078 [cit. 2022-03-24]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.004499

[62] PAIRA, Daniela Andrea, Guillermo MOLINA, Andrea Daniela TISSERA, Carolina OLIVERA, Rosa Isabel MOLINA a Ruben Dario MOTRICH. Results from a large cross-sectional study assessing Chlamydia trachomatis, Ureaplasma spp. and Mycoplasma hominis urogenital infections in patients with primary infertility. *Scientific Reports* [online]. 2021, **11**(1) [cit. 2022-04-30]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-93318-1

[63] PANT, Neeraj Chandra, Ravinder SINGH, Vijaya GUPTA, Aditi CHAUHAN, Ravimohan MAVUDURU, Vijay PRABHA a Prince SHARMA. Contraceptive efficacy of sperm agglutinating factor from Staphylococcus warneri, isolated from the cervix of a woman with inexplicable infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology* [online]. 2019, **17**(1) [cit. 2022-03-28]. ISSN 1477-7827. Dostupné z: doi:10.1186/s12958-019-0531-6

[64] PATEL, Nayna, Nidhi PATEL, Sejal PAL, et al. Distinct gut and vaginal microbiota profile in women with recurrent implantation failure and unexplained infertility. *BMC Women's Health* [online]. 2022, **22**(1) [cit. 2022-04-15]. ISSN 1472-6874. Dostupné z: doi:10.1186/s12905-022-01681-6

[65] PATRAS, Kathryn A., Philip A. WESCOMBE, Berenice RÖSLER, John D. HALE, John R. TAGG, Kelly S. DORAN a A. CAMILLI. Streptococcus salivarius K12 Limits Group B Streptococcus Vaginal Colonization. *Infection and Immunity* [online]. 2015, **83**(9), 3438-3444 [cit. 2022-03-31]. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.00409-15

[66] PERIC, Adriana, Jürgen WEISS, Nicolas VULLIEMOZ, David BAUD a Milos STOJANOV. Bacterial Colonization of the Female Upper Genital Tract. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(14) [cit. 2021-12-03]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20143405

[67] POSTERARO, Brunella, Maurizio SANGUINETTI, Giuseppina D'AMORE, Luca MASUCCI, Giulia MORACE a Giovanni FADDA. Molecular and Epidemiological Characterization of Vaginal Saccharomyces cerevisiae Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 1999, **37**(7), 2230-2235 [cit. 2022-01-11]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.37.7.2230-2235.1999

[68] POWELL, Anna M. a Paul NYIRJESY. *Recurrent vulvovaginitis* [online]. 2014, **28**(7), 967-976 [cit. 2022-04-28]. ISSN 15216934. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpobgyn.2014.07.006

[69] PRABHA, Vijay, Teena Dhir AANAM a Siftjit KAUR. Bacteriological Study of the Cervix of Females Suffering from Unexplained Infertility. *American Journal of Biomedical Sciences* [online]. 2011, **3**(2), 84-89 [cit. 2022-04-29]. ISSN 19379080. Dostupné z: doi:10.5099/aj110200084

[70] PUNZÓN-JIMÉNEZ, Paula a Elena LABARTA. The impact of the female genital tract microbiome in women health and reproduction: a review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* [online]. 2021, **38**(10), 2519-2541 [cit. 2022-03-10]. ISSN 1058-0468. Dostupné z: doi:10.1007/s10815-021-02247-5

[71] QIN, Hanyu a Bingbing XIAO. Research Progress on the Correlation Between Gardnerella Typing and Bacterial Vaginosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2022, **12**(858155) [cit. 2022-04-09]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2022.858155

[72] RAABE, Vanessa N., Andi L. SHANE, Vincent A. FISCHETTI, Richard P. NOVICK, Joseph J. FERRETTI, Daniel A. PORTNOY a Julian I. ROOD. Group B Streptococcus (Streptococcus agalactiae). *Microbiology Spectrum* [online]. 2019, **7**(2) [cit. 2022-04-02]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0007-2018

[73] RAMPERSAUD, Ryan, Tara M. RANDIS a Adam J. RATNER. Microbiota of the upper and lower genital tract. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* [online]. 2012, **17**(1), 51-57 [cit. 2022-03-13]. ISSN 1744165X. Dostupné z: doi:10.1016/j.siny.2011.08.006

[74] RICCI, Susanna, Stefano DE GIORGI, Elisa LAZZERI, et al. Impact of asymptomatic genital tract infections on in vitro Fertilization (IVF) outcome. *PLOS ONE* [online]. 2018, **13**(11) [cit. 2022-03-03]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0207684

[75] ROCK, C. a M.S. DONNENBERG. Human Pathogenic Enterobacteriaceae. *Reference Module in Biomedical Sciences* [online]. Elsevier, 2014, 2014 [cit. 2022-04-25]. ISBN 9780128012383. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.00136-7

[76] SAFARPOOR DEHKORDI, F., B. TAVAKOLI-FAR, S. JAFARIASKARI, H. MOMTAZ, S. ESMAEILZADEH, R. RANJBAR a M. RABIEI. Uropathogenic Escherichia coli in the high vaginal swab samples of fertile and infertile women: virulence factors, O-serogroups, and phenotyping and genotyping characterization of antibiotic resistance. *New Microbes and New Infections* [online]. 2020, **38**, 1-12 [cit. 2022-03-01]. ISSN 20522975. Dostupné z: doi:10.1016/j.nmni.2020.100824

[77] SAFARPOURDEHKOURDI, Farhad, Hasan MOMTAZ, Sedighe ESMAILZADE a et al. Detection of virulence factors of Uropathoigenic Escherichia coli isolates from infertile women high vaginal swabs. *Iran J Med Microbiol* [online]. 2014, **7**(4), 1-8 [cit. 2022-04-29].

[78] SARAF, Viqar Sayeed, Sohail Aslam SHEIKH, Aftab AHMAD, Patrick M. GILLEVET, Habib BOKHARI a Sundus JAVED. Vaginal microbiome: normalcy vs dysbiosis. *Archives of Microbiology* [online]. 2021, **203**(7), 3793-3802 [cit. 2021-12-03]. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-021-02414-3

[79] SAVINI, Vincenzo, Roberta MARROLLO, Claudio FARINA, Paolo FAZII a Domenico D'ANTONIO. Saccharomyces cerevisiae versus Candida in the Liofilchem(®) A.F. Genital System. *Int J Clin Exp Pathol* [online]. 2013, 15.01.2013, **6**(2), 323-325 [cit. 2022-01-12]. ISSN 1936-2625/IJCEP1210009.

[80] SEIFOLESLAMI, Mehri, Aghdas SAFARI a Maryam KHAYYAT KHAMENEIE. Prevalence of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in High Vaginal Swab Samples of Infertile Females. *Iranian Red Crescent Medical Journal* [online]. 2015, **17**(12) [cit. 2022-04-30]. ISSN 2074-1804. Dostupné z: doi:10.5812/ircmj.16823

[81] SHOKOOHI, Gholamreza, Javad JAVIDNIA, Hossein MIRHENDI, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility profiles of Candida dubliniensis and Candida africana isolated from vulvovaginal candidiasis: A single-centre experience in Iran. *Mycoses* [online]. 2021, **64**(7), 771-779 [cit. 2022-03-08]. ISSN 0933-7407. Dostupné z: doi:10.1111/myc.13280

[82] SCHENK, Michael, Lukas GRUMET, Julia STERNAT, Nina REINSCHISSLER a Gregor WEISS. Effect of probiotics on vaginal Ureaplasma parvum in women suffering from unexplained infertility. *Reproductive BioMedicine Online* [online]. 2021, **43**(3), 503-514 [cit. 2022-04-30]. ISSN 14726483. Dostupné z: doi:10.1016/j.rbmo.2021.06.004

[83] SIRICHOAT, Auttawit, Ana Belén FLÓREZ, Lucía VÁZQUEZ, Pranom BUPPASIRI, Marutpong PANYA, Viraphong LULITANOND a Baltasar MAYO. Antibiotic Resistance-Susceptibility Profiles of Enterococcus faecalis and Streptococcus spp. From the Human Vagina, and Genome Analysis of the Genetic Basis of Intrinsic and Acquired Resistances. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2020, **11**(1438), 1-10 [cit. 2021-12-10]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2020.01438

[84] SIROTA, Ido, Shvetha ZAREK a James SEGARS. Potential Influence of the Microbiome on Infertility and Assisted Reproductive Technology. *Seminars in Reproductive Medicine* [online].

2014, **32**(01), 035-042 [cit. 2022-04-26]. ISSN 1526-8004. Dostupné z: doi:10.1055/s-0033-1361821

[85] SMAOUI, Mariem, Kebbi CAROLE, Hanen SELLAMI, et al. Human miscarriage and infection in Tunisia: Role of Mycoplasma hominis and high Waddlia seroprevalence. *The Journal of Infection in Developing Countries* [online]. 2019, **13**(05), 410-418 [cit. 2022-04-30]. ISSN 1972-2680. Dostupné z: doi:10.3855/jidc.9829

[86] SMITH, Steven B a Jacques RAVEL. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *The Journal of Physiology* [online]. 2017, **595**(2), 451-463 [cit. 2022-03-13]. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/JP271694

[87] STØDKILDE, Kristian, Anja POEHLEIN, Holger BRÜGGEMANN a Irene L. G. NEWTON. Draft Genome Sequence of a New Staphylococcal Species Isolated from Human Skin. *Microbiology Resource Announcements* [online]. 2020, **9**(6), e01499-19 [cit. 2022-03-24]. ISSN 2576-098X. Dostupné z: doi:10.1128/MRA.01499-19

[88] SU, Hai-Nan, Kang LI, Long-Sheng ZHAO, et al. Structural Visualization of Septum Formation in Staphylococcus warneri Using Atomic Force Microscopy. *Journal of Bacteriology* [online]. 2020, **202**(19) [cit. 2022-03-26]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.00294-20

[89] SUN, Zhewei, Xueya ZHANG, Danying ZHOU, et al. Identification of Three Clf-Sdr Subfamily Proteins in Staphylococcus warneri, and Comparative Genomics Analysis of a Locus Encoding CWA Proteins in Staphylococcus Species. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2021, **12**(691087) [cit. 2022-03-28]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2021.691087

[90] TAO, Zhi, Lei ZHANG, Qiongqiong ZHANG, et al. The Pathogenesis Of Streptococcus anginosus In Aerobic Vaginitis. *Infection and Drug Resistance* [online]. 2019, **12**, 3745-3754 [cit. 2022-03-18]. ISSN 1178-6973. Dostupné z: doi:10.2147/IDR.S227883

[91] TROST, Eva, Susanne GÖTKER, Jessica SCHNEIDER, et al. Complete genome sequence and lifestyle of black-pigmented Corynebacterium aurimucosum ATCC 700975 (formerly C. nigricans CN-1) isolated from a vaginal swab of a woman with spontaneous abortion. *BMC Genomics* [online]. 2010, **11**(1) [cit. 2022-02-25]. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2164-11-91

[92] VAN HOECKE, Frederik, Ellen BEUCKELAERS, Peter LISSENS a Michael BOUDEWIJNS. Actinomyces urogenitalis Bacteremia and Tubo-Ovarian Abscess after an In Vitro Fertilization (IVF) Procedure. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2013, **51**(12), 4252-4254 [cit. 2022-02-13]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.02142-13

[93] VAN OOSTRUM, N., P. DE SUTTER, J. MEYS a H. VERSTRAELEN. Risks associated with bacterial vaginosis in infertility patients: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction* [online]. 2013, **28**(7), 1809-1815 [cit. 2022-04-25]. ISSN 0268-1161. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/det096

[94] VIDOTTO, Valerio, Barbara MANTOAN, Agostino PUGLIESE, José PONTÓN, Guillermo QUINDÓS, Shigeji AOKI a Shoko ITO-KUWA. Adherence of Candida albicans and Candida dubliniensis to buccal and vaginal cells. *Rev Iberoam Micol* . [online]. 2003, 6.6.2003, **20**(2), 52-54 [cit. 2022-03-05].

[95] VITALE, Salvatore Giovanni, Federico FERRARI, Michał CIEBIERA, et al. The Role of Genital Tract Microbiome in Fertility: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(1) [cit. 2022-04-09]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23010180

[96] VYLKOVA, Slavena, Aaron J. CARMAN, Heather A. DANHOF, John R. COLLETTE, Huaijin ZHOU, Michael C. LORENZ a John W. TAYLOR. The Fungal Pathogen Candida albicans Autoinduces Hyphal Morphogenesis by Raising Extracellular pH. *MBio* [online]. 2011, **2**(3), e00055-11 [cit. 2022-04-28]. ISSN 2161-2129. Dostupné z: doi:10.1128/mBio.00055-11

[97] WRIGHT, Victoria, Jeani CHANG, Gary JENG a Maurizio MACALUSO. Assisted reproductive technology surveillance. *MMWR Surveill Summ* [online]. 2008, **57**(5), 1-23 [cit. 2022-04-26].

[98] ZHANG, Fenghao, Jie DAI a Tingtao CHEN. Role of Lactobacillus in Female Infertility Via Modulating Sperm Agglutination and Immobilization. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2021, **10**(620529), 1-12 [cit. 2022-04-05]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2020.620529

[99] ZHOU, Xia, Rachel WESTMAN, Roxana HICKEY, Melanie A. HANSMANN, Colleen KENNEDY, Thomas W. OSBORN a Larry J. FORNEY. Vaginal Microbiota of Women with Frequent Vulvovaginal Candidiasis. *Infection and Immunity* [online]. 2009, **77**(9), 4130-4135 [cit. 2022-04-28]. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.00436-09

[100] ZHU, MINGHUI, QIANG ZHU, ZHEN YANG a ZHIXIN LIANG. Clinical Characteristics of Patients with Micrococcus luteus Bloodstream Infection in a Chinese Tertiary-Care Hospital. *Polish Journal of Microbiology* [online]. 2021, **70**(3), 321-326 [cit. 2022-03-18]. ISSN 2544-4646. Dostupné z: doi:10.33073/pjm-2021-030

[101] ZUÑIGA-BAHAMON, Andres, Fabian TOBAR-TOSSE, Jose GUILLERMO-ORTEGA, Daniel WIBBERG a Andreas TAUCH. Draft Genome Sequence of Streptococcus anginosus BVI, a New Vaginal Pathogen Candidate. *Genome Announcements* [online]. 2016, **4**(6), e01417-16 [cit. 2022-03-30]. ISSN 2169-8287. Dostupné z: doi:10.1128/genomeA.01417-16

[102] LALÁKOVÁ, Lucie. DNA-detekce *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* ve vzorcích z urogenitálního traktu mužů a žen. Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, 2012.

7 PŘÍLOHY

Příloha A- Krevní agar s naočkovaným vzorkem pacientky (48 hodin, 37 °C) 73

Příloha B- Krevní agar s naočkovaným vzorkem pacientky (vlevo) (48 hodin, 37 °C).....74

Příloha C- Čokoládový agar s naočkovaným vzorkem pacientky (vlevo) (48 hodin, 37 °C) ..75

Příloha D- Endův agar s naočkovaným vzorkem pacientky (vlevo) (48 hodin, 37 °C) 76

Příloha E- Mikrobiální poševní obraz se shluky mikroorganismů a epitelialní buňkou, zvětšení 1000x 77

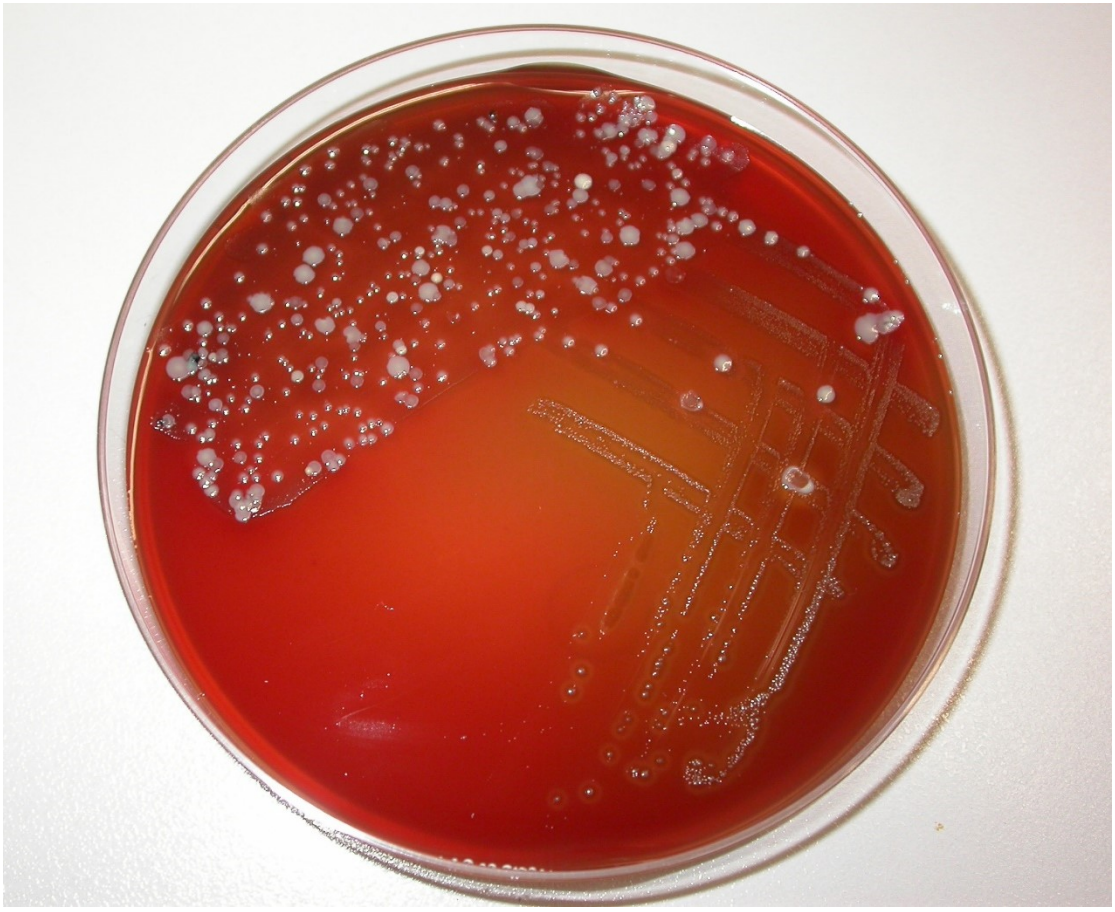
Příloha F- Mikrobiální poševní obraz s adherovanými mikroorganismy k epiteliání buňce, zvětšení 1000x 78

Příloha G- Mikrobiální poševní obraz s blastokonidií kasinky a leukocytem, zvětšení 1000x 79

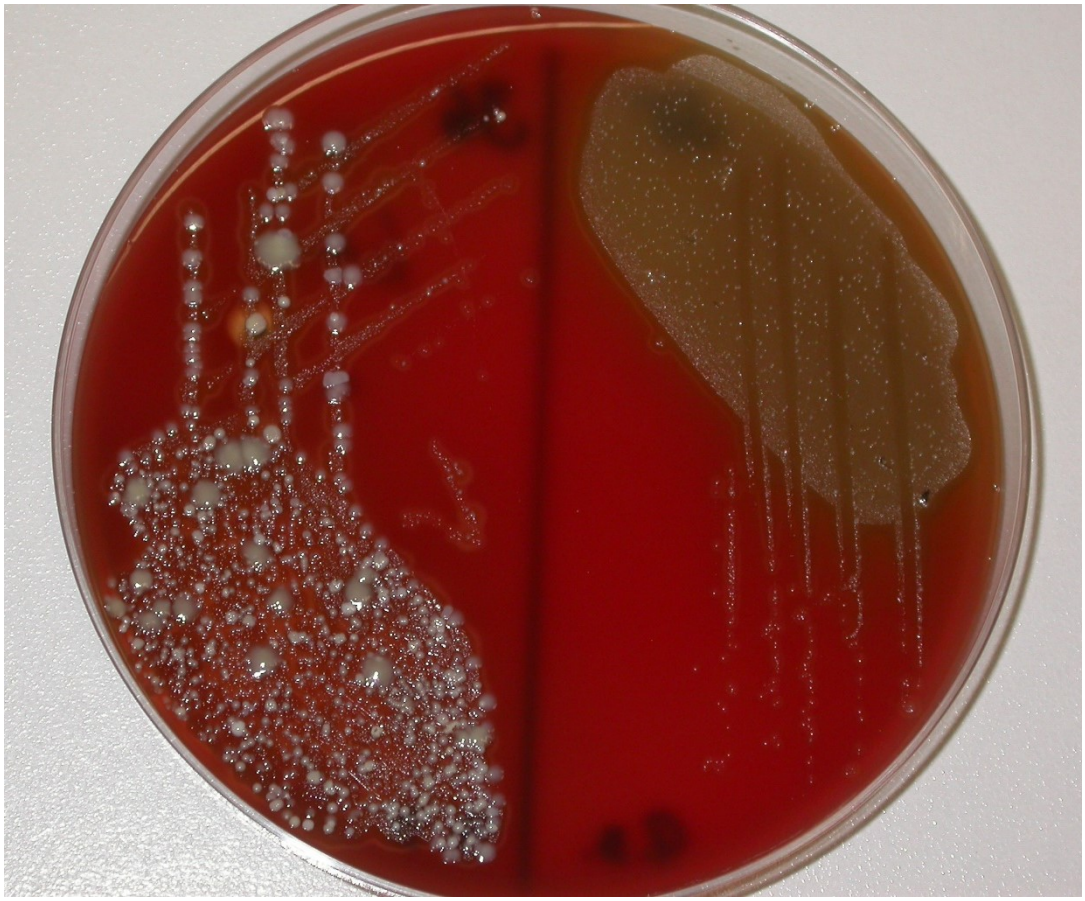
Příloha H- Mikrobiální poševní obraz se záplovou leukocytů, zvětšení 1000x 80

Příloha I- Mikrobiální poševní obraz s vaginální epitelií a blastokonidiemi kvasinky, zvětšení 1000x 81

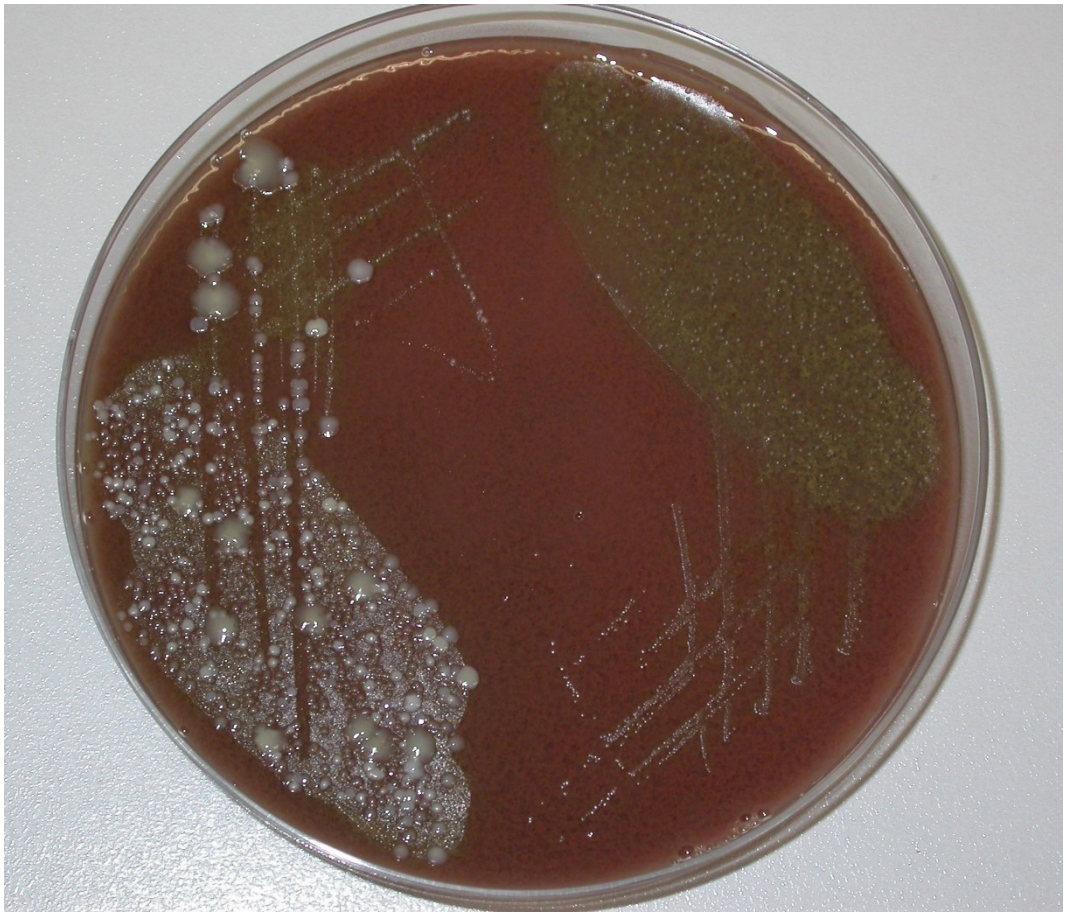
Příloha A- Krevní agar s naočkovaným vzorkem pacientky (48 hodin, 37 °C)



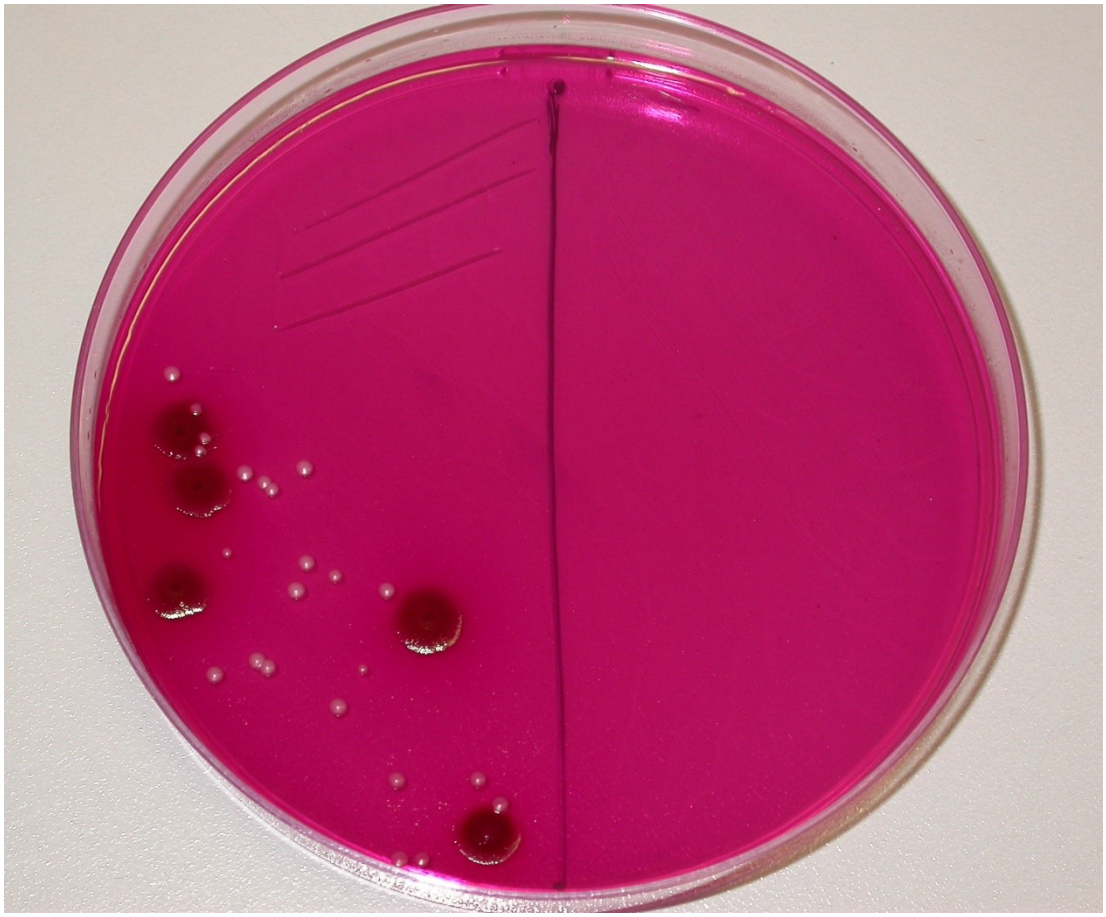
Příloha B- Krevní agar s naočkovaným vzorkem pacientky (vlevo) (48 hodin, 37 °C)



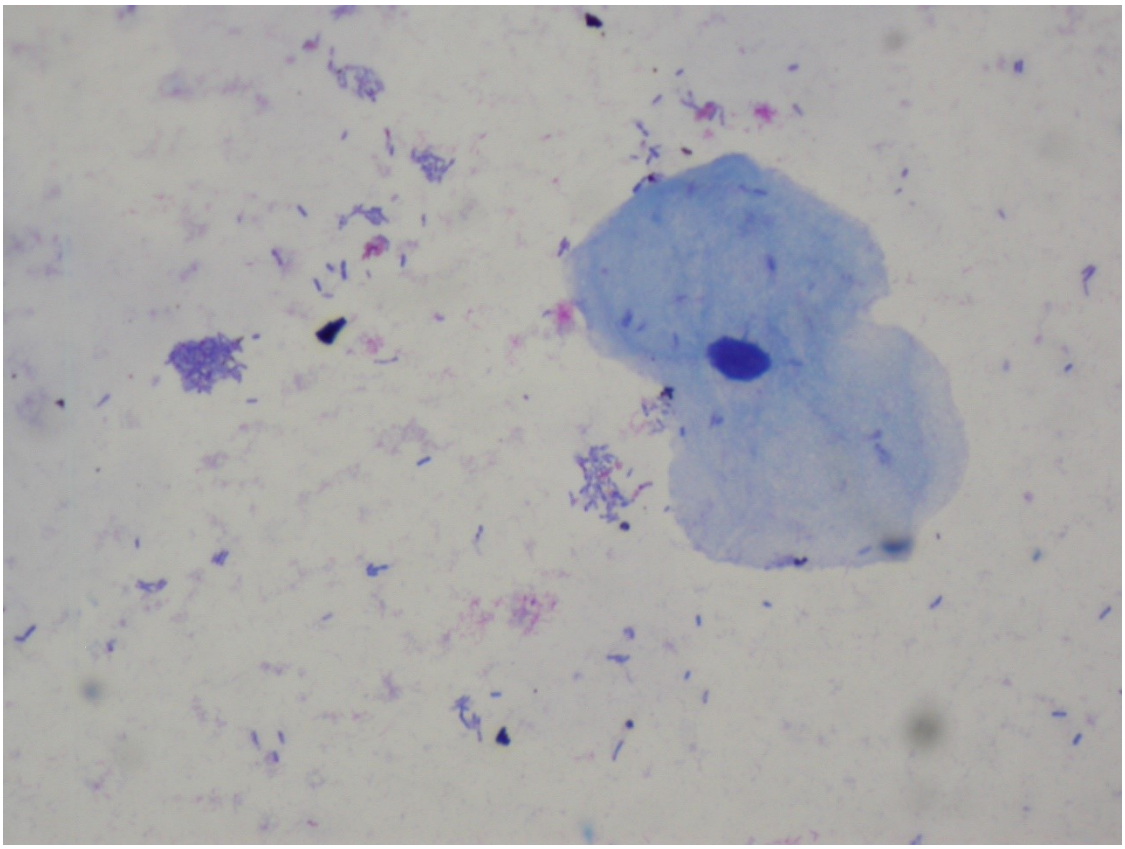
Příloha C- Čokoládový agar s naočkovaným vzorkem pacientky (vlevo) (48 hodin, 37 °C)



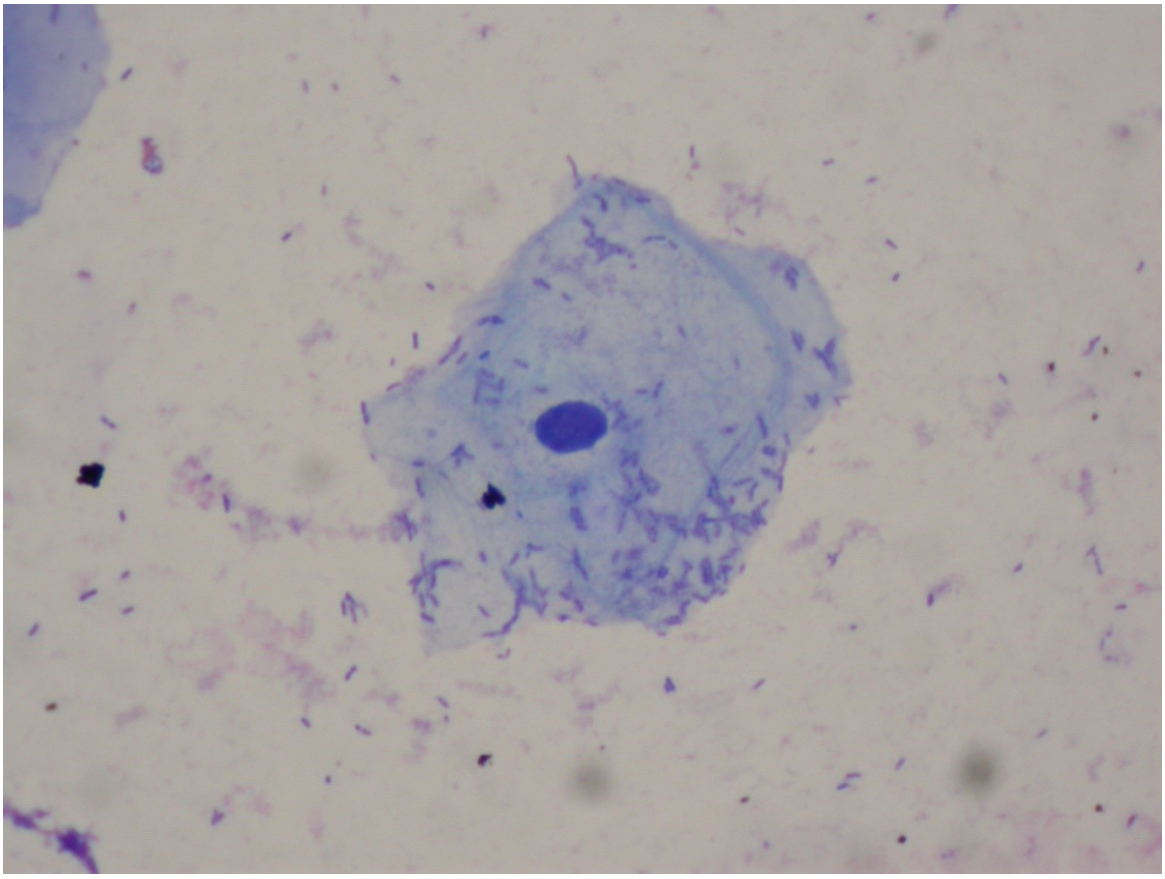
Příloha D- Endův agar s naočkovaným vzorkem pacientky (vlevo) (48 hodin, 37 °C)



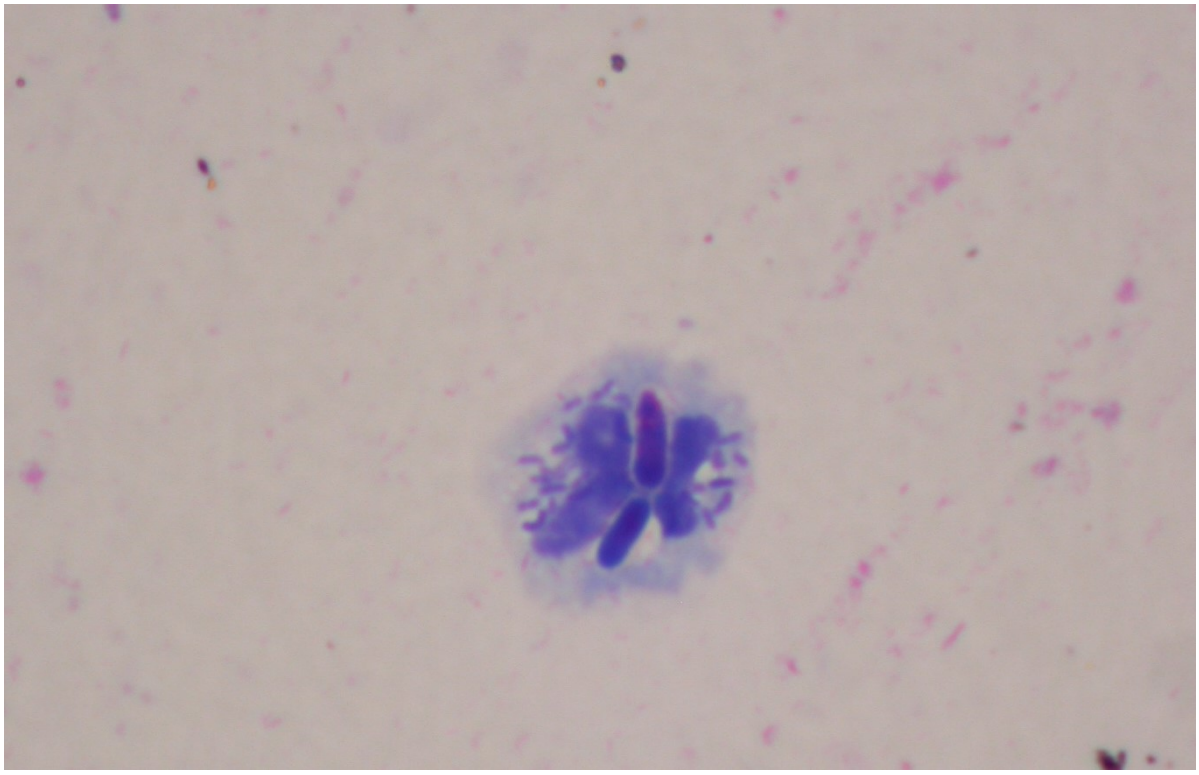
Příloha E- Mikrobiální poševní obraz se shluky mikroorganismů a epitelialní buňkou, zvětšení 1000x



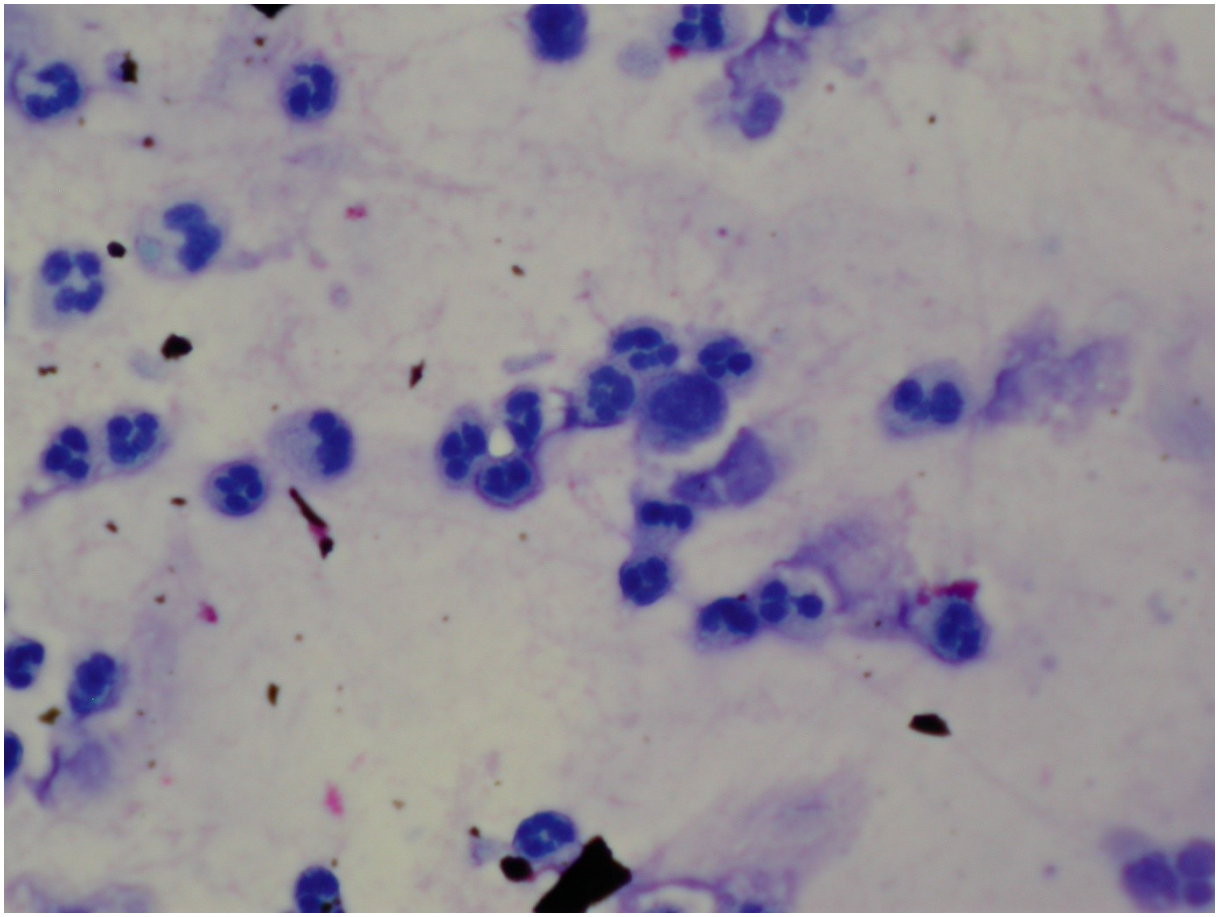
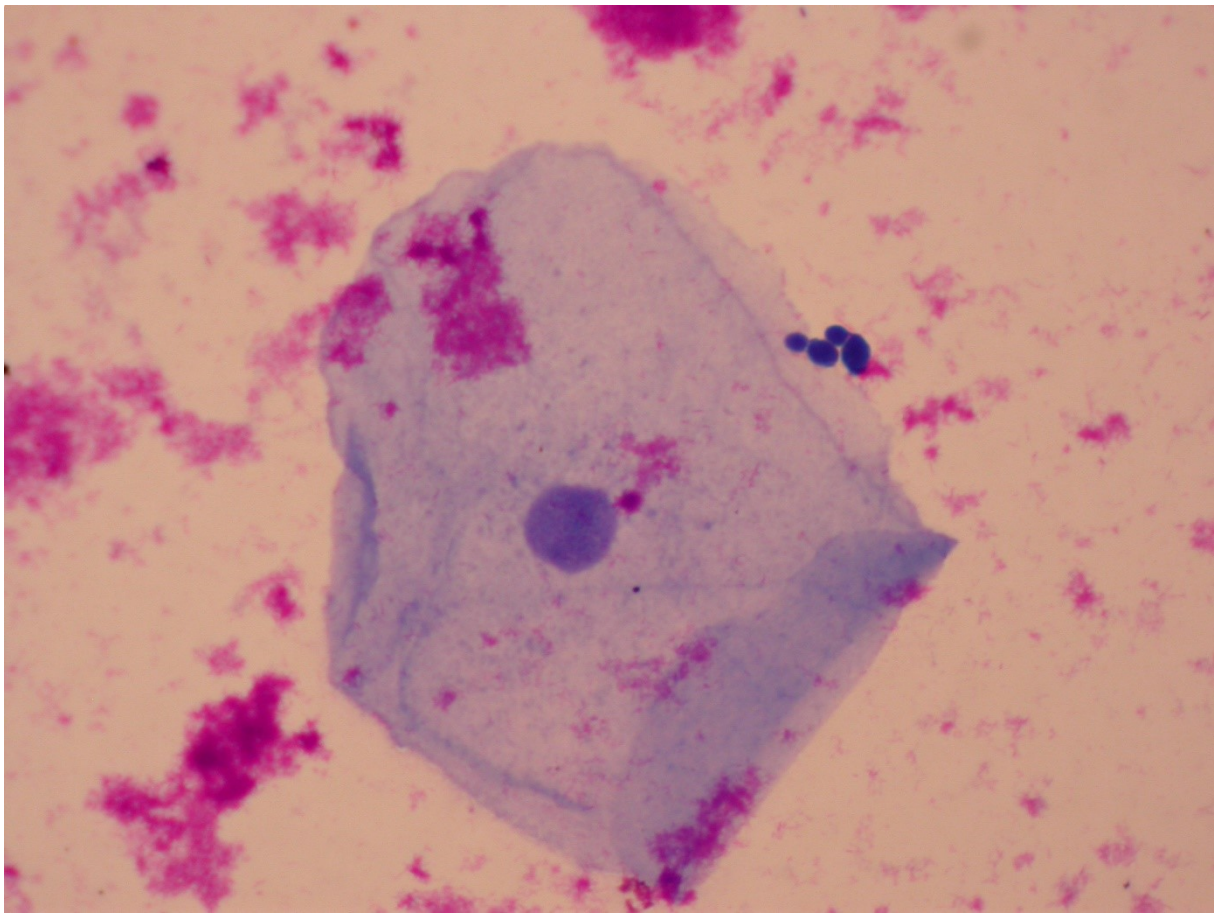
Příloha F- Mikrobiální poševní obraz s adherovanými mikroorganismy k epiteliání buňce, zvětšení 1000x



Příloha G- Mikrobiální poševní obraz **s** blastokonidií kasinky a leukocytem, zvětšení 1000x



Příloha H- Mikrobiální poševní obraz se záplovou leukocytů, zvětšení 1000x



Příloha I- Mikrobiální poševní obraz s vaginální epitelií a blastokonidiemi kvasinky, zvětšení 1000x