



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Mikrobiální kontaminace brýlových a  
kontaktních čoček**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

|                         |                                    |
|-------------------------|------------------------------------|
| Autor:                  | <b>Nikola Glosová</b>              |
| Studijní program:       | B1501 Experimentální biologie      |
| Studijní obor:          | Experimentální biologie            |
| Forma studia:           | Prezenční                          |
| Vedoucí práce:          | <b>RNDr. Lucie Janovská, Ph.D.</b> |
| Termín odevzdání práce: | 2019                               |

## Bibliografická identifikace

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora | Nikola Glosová  |
| Název práce             | Mikrobiální kontaminace brýlových a kontaktních čoček   |
| Typ práce               | Bakalářská  |
| Pracoviště              | Laboratoř růstových regulátorů  |
| Vedoucí práce           | RNDr. Lucie Janovská, Ph.D.   |
| Rok obhajoby práce      | 2019  |
| Abstrakt                | <p>Teoretická část bakalářské práce se zabývá mikrobiomem člověka, jak ovlivňuje lidský organismus, zda je prospěšný nebo naopak škodlivý. Podrobněji je zde rozebrán mikrobiom kůže a oka, kterému se práce věnuje. Důležitá je rychlá a přesná identifikace bakterií, kdy se hodnotí fenotypové a genotypové vlastnosti. Významná je také schopnost některých bakterií růst ve formě biofilmu. V rámci experimentální části bakalářské práce bylo získáno celkem 50 vzorků z brýlových a kontaktních čoček. Vykultivované kolonie byly následně izolovány do čisté kultury a identifikovány pomocí MS MALDI ToF. U získaných izolátů byla stanovena schopnost růstu ve formě biofilmu a u zástupců rodu <i>Staphylococcus</i> navíc stanovena pomocí genetických a fenotypových metod rezistence k methicilinu.</p> |
| Klíčová slova           | Kontaktní čočky, brýlové čočky, biofilm, Christensenova metoda  |
| Počet stran             | 44  |
| Počet příloh            | 1   |
| Jazyk                   | Česky (Anglicky)  |

## Bibliographical identification

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| Author's first name and surname | Nikola Glosová  |
| Title of thesis                 | Microbial contamination of eyeglass and contact lenses  |
| Type of thesis                  | Bachelor  |
| Department                      | Laboratory of Growth Regulators   |
| Supervisor                      | RNDr. Lucie Janovská, Ph.D.   |
| The year of presentation        | 2019  |
| Abstract                        | <p>The theoretical part of the bachelor thesis deals with human microbiome, how it affects human organism, whether it is beneficial or harmful. It is discussed in more detail the skin and eye microbiome on which the work is devoted. Important is the rapid and accurate identification of bacteria, phenotypic and genotypic properties are evaluated. Also important is the ability of some bacteria to grow in the form of a biofilm. In the experimental part of the thesis, a total of 50 samples of eyeglasses and contact lenses were obtained. The cultured colonies were subsequently isolated into pure culture and identified by MS MALDI Tof. In the isolates, the ability to grow in the form of a biofilm was determined and in addition, methicillin resistance resistance was determined by genetic and phenotypic methods in <i>Staphylococcus</i> sp.</p> |
| Keywords                        | Contact lenses, eyeglasses lenses, biofilm, Christensen's method  |
| Number of pages                 | 44  |
| Number of appendices            | 1   |
| Language                        | Czech (English)   |

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce RNDr. Lucii Janovské, PhD. za vedení, trpělivost, věnovaný čas a vysvětlení dané problematiky.

# Obsah

|  |    |
|--|----|
| Seznam použitých zkratk                | 7  |
| 1. Úvod                                | 8  |
| 2. Cíl práce                           | 9  |
| 3. Teoretická část                     | 10 |
| 3.1 Mikrobiom                          | 10 |
| 3.1.1 Mikrobiom kůže                   | 10 |
| 3.1.2 Mikrobiom oka                    | 13 |
| 3.2 Možnosti identifikace bakterií     | 16 |
| 3.2.1 MS MALDI ToF                     | 17 |
| 3.3 Biofilm                            | 17 |
| 3.3.2 Možnosti průkazu biofilmu        | 18 |
| 3.3.3 Christensenova metoda            | 19 |
| 4. Materiál a metody                   | 20 |
| 4.1 Přístroje a vybavení               | 20 |
| 4.2 Použité chemikálie                 | 21 |
| 4.3 Použité roztoky                    | 21 |
| 4.4 Dotazník                           | 22 |
| 4.5 Sběr materiálu                     | 22 |
| 4.6 Kultivace                          | 22 |
| 4.7 Metoda MS MALDI ToF                | 23 |
| 4.8 Modifikovaná Christensenova metoda | 23 |
| 4.9 Izolace DNA                        | 24 |
| 4.10 PCR                               | 24 |
| 4.11 Difúzní disková metoda            | 25 |
| 5. Výsledky                            | 26 |
| 5.1 Vyhodnocení dotazníků              | 26 |
| 5.2 Mikrobiom                          | 27 |
| 5.3 Schopnost tvorby biofilmu          | 31 |
| 5.4 Detekce rezistence k methicilinu   | 33 |
| 6. Závěr                               | 35 |
| 7. Diskuse                             | 36 |
| 8. Použitá literatura                  | 40 |
| Přílohy                                | 44 |

## Seznam použitých zkratk

|              |  |
|--------------|--|
| AN           | acetonitril  |
| BHI bujón    | Brain-Heart-Infusion bujón   |
| HCCA         | $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, kyselina $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová  |
| F primer     | forward primer   |
| MS MALDI ToF | Mass spectrometry Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem |
| OD           | optická denzita  |
| OR           | organické rozpouštědlo   |
| R primer     | reverse primer   |
| TFA          | trifluoroacetic acid, kyselina trifluoroctová  |
| NC           | negative control, negativní kontrola   |

# 1. Úvod

Mikroorganismy se vyskytují téměř všude kolem nás, ve vodě, v půdě, na rostlinách a živočiších. Mikroorganismy, které osídlují živočichy, včetně člověka, rozlišujeme, na základě jejich vztahu k hostitelskému organismu, na symbiotické a patogenní. Řadíme zde viry, bakterie, kvasinky, vláknité houby, protozoa i vícebuněčné parazity a některé řasy (Votava, 2005).

Pro člověka jsou významné zejména ty, které jsou součástí fyziologické mikroflóry, kde řadíme mikroorganismy, které jsou pro nás prospěšné a neškodí našemu zdraví, např. zabraňují kolonizaci patogenními druhy. Naopak patogenní bakterie zahrnují původce onemocnění (Backhed et al., 2012).

V případě brýlových a kontaktních čoček, které přicházejí do přímého kontaktu s okem, je nutné dodržovat zásady hygieny při nasazování, vydělávání, uchovávání a čištění čoček. Důležité je také dbát na dobu nošení čoček. Přenášení podporuje snížení tkáňové rezistence, a tak mohou mikroorganismy infikovat a kolonizovat rohovku nebo spojivku za vzniku infekcí. Na povrchu kontaktní čočky může docházet k uchycení bakterií, které zde začnou často tvořit biofilm. Studie zabývající se mikrobiomem nošených kontaktních čoček může vést k vývoji nových materiálů, na kterých by se např. netvořil bakteriální biofilm, který je v případě kontaktních čoček velkým problémem (Bonini et al., 2005).



## 2. Cíl práce

1. Sestavit dotazník s cílem zjistit používaný typ čoček. V případě používání kontaktních čoček zjistit typ, a zda uživatel čočky přenáší a jak se o ně stará a uchovává je.
2. Získaný materiál (stěr z brýlových čoček, kontaktní čočky) vyšetřit pomocí kultivačních metod.
3. Vykultivované mikroorganismy identifikovat pomocí MS MALDI ToF.
4. Vyhodnotit získané výsledky.

## 3. Teoretická část

### 3.1 Mikrobiom

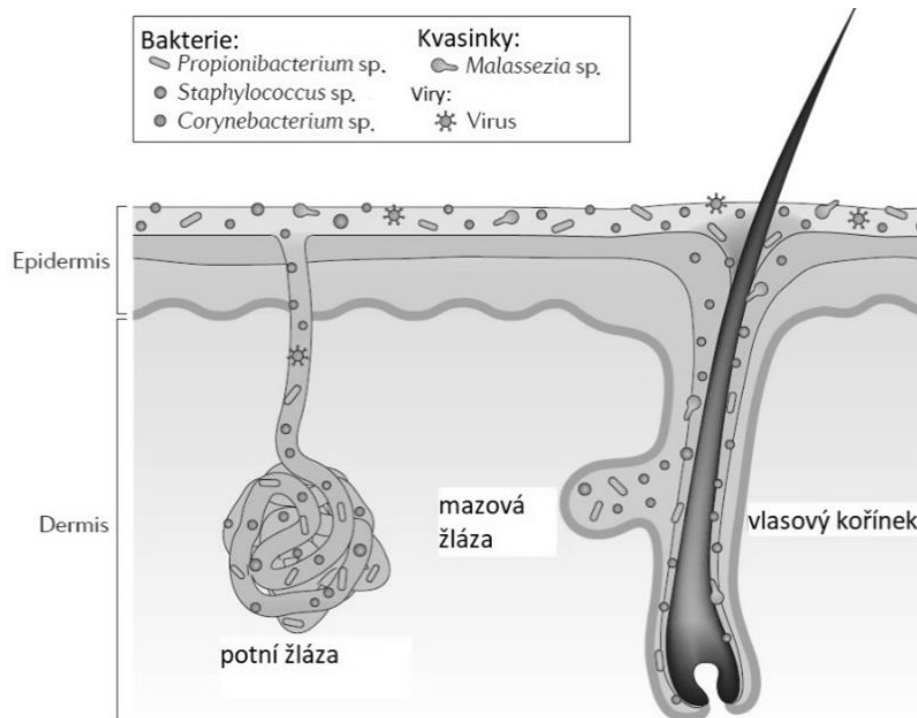
Pojem lidský mikrobiom představuje všechny mikroorganismy, které osídlují lidské tělo. Zahrnuje nejen bakterie a kvasinky, ale i viry. Lidské tělo je sídlem velkého množství symbiotických a komenzálních (nepatogenních) a patogenních mikrobiálních druhů, které se vyvinuly společně s lidským genomem, adaptivním imunitním systémem a stravou. Lidský genom je součástí kolektivního genomu komplexních komenzálních, symbiotických a patogenních mikrobiálních komunit kolonizující lidské tělo. Střevní mikrobiota souhrnně vyjadřuje více než 3,3 milionu bakteriálních genů, zatímco lidský genom vyjadřuje pouze 20 tisíc genů (Backhed et al., 2012).

Mikrobiota má zásadní roli při indukci, tréninku a funkci hostitelského imunitního systému. Imunitní systém slouží jako prostředek k udržení symbiotického vztahu hostitele s těmito velmi rozmanitými a vyvíjejícími se mikroby. Za normálních podmínek imunitní systém – mikrobiální aliance, umožňuje indukci ochranných reakcí na patogeny a udržování regulačních cest, které se podílejí na zachování tolerance k neškodným antigenům. Nicméně, zejména v pokročilých zemích, dochází k nadužívání antibiotik, změnám ve stravě a dalším změnám, které vedou k možné pomalejší tvorbě vyvážené imunitní odpovědi (Belkaid a Hand, 2014).

Mnohé studie potvrzují, že manipulace s nepatogenními bakteriálními kmeny v hostiteli může stimulovat obnovení imunitní odpovědi na patogenní bakterie způsobující onemocnění. Proto byly vyvinuty nové přístupy terapie pro kontrolu nerovnováhy ve střevní mikroflóře (dysbiózy) a běžných onemocnění (např. obezita), například použití nutraceutik (probiotika a prebiotika) nebo speciálních fágů vytvořených pomocí systémů CRISPR/Cas (Belizário a Napolitano, 2015).

#### 3.1.1 Mikrobiom kůže

Kůže je největším orgánem lidského těla, který navíc představuje rozhraní mezi vnějším a vnitřním světem, kdy plní funkci bariéry. Nepříznivé prostředí kůže pro osídlení mikroorganismy, které je dané kyselým pH, malým množstvím dostupných živin, přispívá k přirozené obranyschopnosti a je součástí nespecifické imunity. Navzdory tomu, je kůže kolonizována různorodou mikrobiotou zahrnující více než 100 mikrobiálních zástupců. Většina z nich je neškodná nebo dokonce prospěšná pro svého hostitele (obrázek 1) (Rosenthal et al., 2011; Ladizinski et al., 2014; Zhou et al., 2014; Byrd et al., 2018).



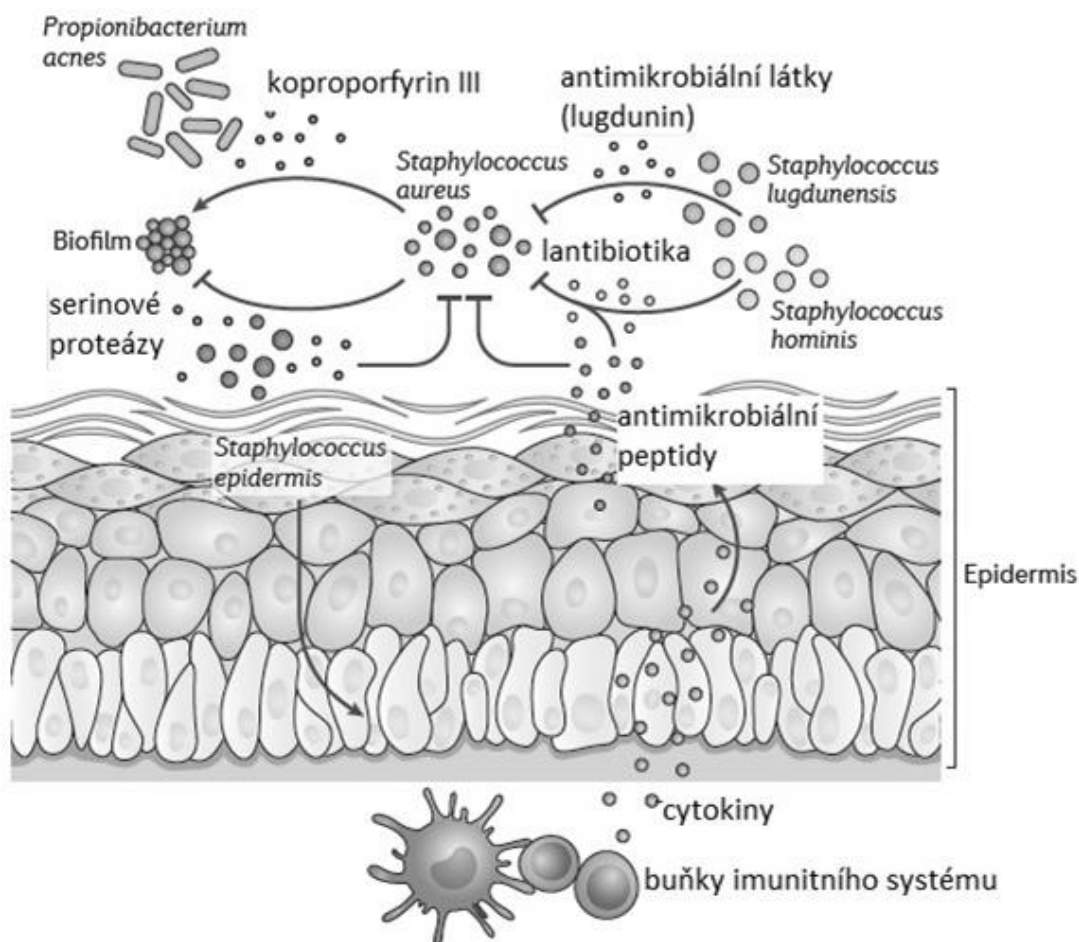
Obrázek 1: Fyziologie kůže (upraveno podle Byrd et al., 2018).

Mikrobiální zastoupení a rozmanitost fyziologické flóry se liší mezi lidskými rasami, i ve vztahu k zeměpisné poloze. Kolonizace je ovlivněna mimo jiné zejména životním prostředím a vrstvou epidermis na povrchu kůže (Grice et al., 2009; Rosenthal et al., 2011).

Kožní mikrobiální společenství jsou formována interakcemi mezi organismy a hostitelem. Na kůži bylo identifikováno mnoho interakcí mezi komenzály a zejména bakteriálním druhem *Staphylococcus aureus* (obrázek 2). Antimikrobiální látky, např. lugdunin, které jsou produkovány koaguláza negativními zástupci rodu *Staphylococcus*, konkrétně druhem *Staphylococcus lugdunensis*, zamezují kolonizaci druhem *S. aureus*.

Také druh *Staphylococcus epidermidis* může inhibovat kolonizaci a tvorbu biofilmu u druhu *S. aureus* produkcí serinových proteáz (např. glutamyl endopeptidáza). Tyto kmeny *S. epidermidis* navíc indukují keratinocyty v produkci antimikrobiálních peptidů prostřednictvím signalizace imunitním buňkám a buňky *S. aureus* jsou tak účinně usmrceny.

Látky, produkované druhem *Staphylococcus hominis*, tzv. lantibiotika, synergizují s lidským antimikrobiálním peptidem LL-37 (katelicidin) za účelem snížení kolonizace *S. aureus*. Na rozdíl od zmíněných zástupců fyziologické mikroflóry kůže, produkuje *Propionibacterium acnes* koproporfyrin III, který podporuje agregaci buněk *S. aureus* a tvorbu biofilmu (Byrd et al., 2018).



Obrázek 2: Kožní komenzální interakce s druhem *Staphylococcus aureus* (upraveno podle Byrd et al., 2018).

V rámci jiných studií se hojně na pokožce vyskytuje druh *Actinobacteria phylum*. Grampozitivní druhy *Staphylococcus epidermidis* a *Propionibacterium acnes* jsou potom převládajícími mikroorganismy na lidském epitelu a v tukových folikulech. *Propionibacterium acnes* kolonizuje také zdravé póry a je zodpovědný za produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA, *short chain fatty acids*) a thiopeptidů, které inhibují růst jiných bakteriálních druhů, např. *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*. Nicméně, v závislosti na hostitelském imunitním systému, přetížení a zanášení pórů umožňují následnou kolonizaci dalšími bakteriemi (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. a *Corynebacterium* sp.) a kvasinkami (*Candida* sp. a *Malassezia* sp.), které jsou často spojovány s řadou kožních onemocnění, včetně atopické dermatitidy a abnormálního odlupování a svědění pokožky hlavy (Grice et al., 2009).

Kožní mikrobiota je pod autonomní kontrolou lokálního kožního imunitního systému, takže je nezávislá na systémové imunitní odpovědi, která je modulována střevní

mikroflórou (Naik et al., 2012). Hlavní vrozený mechanismus antimikrobiální obrany na pokožce se skládá z adenosinmonofosfátu (AMP) a peptidů (např. defenzinů, kathelicidinu a dermicidinu). Tyto peptidy představují důležité nástroje při kontrole kožních patogenních bakterií i bakterií podílejících se na onemocnění plic a gastrointestinálního traktu. Mnoho molekul AMP se váže na fosfolipidové membránové povrchy, vytváří iontové kanály a póry, a může dojít až k buněčné smrti (Guani-Guerra et al., 2010; Ostaff et al., 2013).

### 3.1.2 Mikrobiom oka

Oftalmologové tvrdí, že po nástupu kontaktních čoček, zaznamenali častější výskyt očních infekcí než dříve. Ví se jen málo o mikroorganismech, které se vyskytují fyziologicky na povrchu lidského oka, a o jejich odlišnosti od patogenních kmenů. Mnoho bakterií kolonizujících povrch oka je těžké vykultivovat, což je dělá 'neviditelnými' pro výzkum.

U většiny částí lidského těla, jako je střevo, dutina ústní, nosohltan, je popsána fyziologická flóra. Mikrobiom očního povrchu se liší od mikrobiomu v ústní dutině, kterému dominují zástupci rodů *Neisseria* (*N. sica*, *N. lactamica*, *N. subflava*) a *Streptococcus* (*S. oralis*, *S. mutans* a další) (Lazarevic et al., 2009), nebo v dýchacích cestách, které jsou převážně osídleny zástupci aktinobakterií (*Corynebacterium*, *Aereobacterium* a *Rhodococcus*) (Rasmussen et al., 2000). Mikrobiální komunita očního povrchu nese podobnost s kůží, která je osídlena zástupci proteobakterií (Grice et al., 2008).

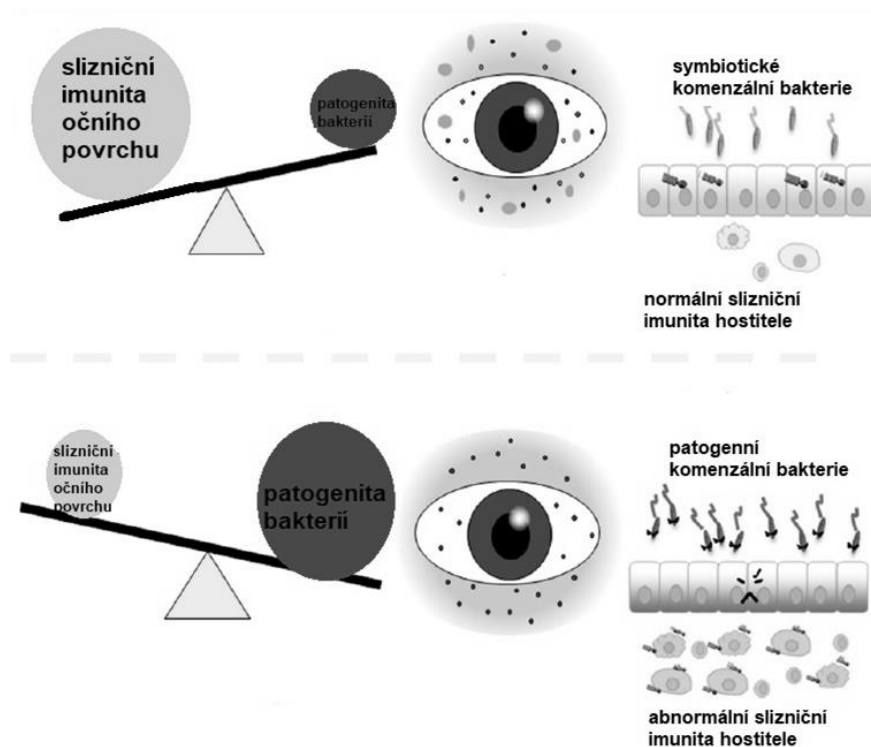
Ještě v nedávné době se vědci domnívali, že oko není fyziologicky osídleno mnoha mikrobiálními druhy, jelikož slzy mají schopnost vyplavovat cizí předměty, včetně bakterií, a působí antimikrobiálně díky např. laktoferinu, který zabraňuje adhezenci bakterií, a lysozymu, který narušuje vazby mezi molekulami peptidoglykanu v buněčné stěně bakterií, a tak způsobuje lyzi buněk. Oční aparát je ovšem hustě osídlen mikroorganismy. Na oku se mohou nacházet až desítky mikroorganismů, i přesto se oko jeví jako zdravé a bez potíží (Shaikh-Lesko, 2014). Mezi tyto mikroorganismy se řadí např. *Pseudomonas* sp., *Propionibacterium* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp. a jiné (tabulka 1) (Dong et al., 2011).

Tabulka 1: Mikrobiom spojivky (převzato z Dong et al., 2011).

| Rod                          | Procentuální zastoupení na spojivce<br>[%] |
|------------------------------|--|
| neklasifikováno              | 31   |
| <i>Pseudomonas</i> sp.       | 18   |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp.    | 12   |
| <i>Propionibacterium</i> sp. | 11   |
| <i>Acinetobacter</i> sp.     | 9  |
| <i>Corynebacterium</i> sp.   | 8  |
| <i>Brevundimonas</i> sp.     | 4  |
| <i>Staphylococcus</i> sp.    | 2  |
| <i>Aquabacterium</i> sp.     | 2  |
| <i>Streptococcus</i> sp.     | 0,5  |
| další se zastoupením <0,5 %  | 3  |

Na zánětlivá onemocnění očí má vliv slizniční vrozená imunita, komenzální bakterie (např. *Staphylococcus epidermidis*) a také genetická výbava hostitele (např. polymorfismy). Unikátní vrozená imunitní reakce epitelových buněk spoluúčinkuje s komenzálními bakteriemi. Patogenita komenzálních bakterií je ovlivněna naopak abnormálním stavem vrozené imunity hostitele. Důležitá je tedy určitá rovnováha mezi komenzálními bakteriemi a hostitelskou imunitou. Když je slizniční imunita hostitele normální, komenzální bakterie jsou v symbiotickém vztahu se svým hostitelem. Pokud je však slizniční imunita hostitele abnormální, mohou komenzální bakterie působit jako patogenní. K přiklonění k patogenitě bakterií může přispět např. oslabený imunitní stav hostitele (obrázek 3) (Ueta a Kinoshita, 2012).

Studie Leger et al. (2017) poskytla přímý důkaz, že na očním povrchu existuje rezidentní komenzální mikrobiom za použití myšího modelu oka pro stanovení očního mikrobiomu a jeho funkčních a imunologických důsledků. Ve studii byl izolován komenzální druh *Corynebacterium mastitidis*, který vyvolal komenzální specifickou odpověď T-buněk v oční sliznici, která byla důležitá pro lokální imunitu. Tato reakce způsobila přísun neutrofilů a uvolňování antimikrobiálních látek do slz a chránila oko před patogenní infekcí např. *Candida albicans* nebo *Pseudomonas aeruginosa*.



Obrázek 3: Rovnováha mezi slizniční imunitou očního povrchu a patogenitou bakterií (upraveno podle Ueta a Kinoshita, 2012).

Jedním z nejvýznamnějších faktorů vedoucích k infekci rohovky je přenášení kontaktních čoček. Vědci se domnívají, že kontaktní čočky usnadňují patogenům kolonizovat povrch oka. Mark Willcox, lékařský mikrobiolog na Univerzitě New South Wales v Austrálii vyvinul antimikrobiální čočky, které by měly řešit potenciální problém infekcí oka. Willcox spolu s kolegy Debarunem Duttou a Jeromem Ozkanem z Institutu Brien Holden Vision v Sydney spojili přirozeně se vyskytující antimikrobiální peptid melamin s povrchem normálních kontaktních čoček. Ve svých studiích dokázali, že si antimikrobiální čočky udržely aktivitu proti dvěma hlavním patogenům, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. Kontaktní čočky pravděpodobně neovlivňují normální, komenzální bakterie oka. Peptid byl vázán na povrch čočky, což nejspíše ovlivní pouze růst těch mikrobů, které se pokoušejí navázat na povrch čočky a ne ty, které se nacházejí na povrchu oka (Shaikh-Lesko, 2014).

### 3.2 Možnosti identifikace bakterií

K dispozici jsou fenotypové metody, které jsou založeny na morfologii, metabolismu, fyziologii a chemických vlastnostech buňky, a genetické metody. Fenotypové vlastnosti jsou obvykle hodnoceny jako první a jsou využity jako výchozí body pro další charakterizaci mikroorganismů (Moore et al., 2010).

Morfologické znaky buňky (tvar, velikost a další charakteristické struktury) lze určit světelnou a elektronovou mikroskopií, často se využívá barvicích metod. Pomocí světelné mikroskopie se určují obecné vlastnosti buněk, elektronovou mikroskopií lze sledovat struktury uvnitř buňky (cytoplasmatické inkluze, vnitřní membránové struktury apod.). Jako barvicí metoda je v mikrobiologii nejčastěji využíváno Gramovo barvení, které slouží pro rozlišení gram pozitivních a gram negativních bakterií (Gram, 1884). Dále jsou hodnoceny kolonie buněk na vhodné pevné půdě, kdy je hodnocen tvar, velikost, barva, profil a okraje kolonií (Buchanan, 1955).

Pro podrobnější identifikaci mikroorganismů byly vytvořeny biochemické, nutriční, metabolické a fyziologické charakterizační testy (např. oxidačně-fermentační test, katalázový test, KOH test) (Busse et al., 1996).

Genetická identifikace se objevuje jako alternativa nebo doplněk zavedených fenotypových metod. Typicky je genetická identifikace bakterií založena na použití techniky PCR s primery pro amplifikaci např. části genu pro 16S rRNA. Amplifikovaný fragment je analyzován např. pomocí elektroforézy nebo sekvencování (Tang et al., 1998)

Rychlá detekce a identifikace mikroorganismů je důležitá v celé řadě oblastí, od lékařství až po průmysl. Naneštěstí jsou téměř všechny metody identifikace mikroorganismů časově a ekonomicky náročnější. Nejnovější metody využívají molekulární techniky, jako je polymerázové řetězové reakce (PCR), sekvencování nebo elektromigrace, kdy se používá zejména kapilární zónová elektroforéza a kapilární isoelektrická fokusace. Dále je z metod identifikace stále více využívána metoda MS MALDI ToF (Buszewski et al., 2017).



### 3.2.1 MS MALDI ToF

Metoda MS MALDI ToF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*, Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem) poskytuje rychlý, levný a spolehlivý nástroj pro identifikaci bakterií a hub (Kostrzewa a Schubert, 2017).

Obecným principem hmotnostní spektrometrie je produkovat, oddělovat a detekovat ionty plynné fáze. Mezi klasické metody ionizace patří elektronový sprej (EI) a chemická ionizace (CI). Vedle klasických metod je MALDI 'měkká' ionizační technika, která umožňuje analýzu biomolekul (biopolymerů jako jsou proteiny, DNA, peptidy). Každý rod, druh nebo kmen má své charakteristické spektrum, tzv. *fingerprint* (Takeda et al., 1991).

Tato vysoce spolehlivá a přesná druhová identifikace je pro laboratorní diagnostiku zásadním přínosem. Díky výhodám MS MALDI ToF se méně používají dříve běžné biochemické testy, které mají časovou prodlevu (Nyč a Bubeníček, 2015).

### 3.3 Biofilm

Biofilm představuje společenství mikroorganismů jednoho nebo více druhů, ve kterém jsou buňky adherovány navzájem nebo k povrchu. Buňky biofilmu jsou obklopeny matricí, která obsahuje extracelulární polymerní substance (EPS), např. polysacharidy, proteiny, nukleové kyseliny, lipidy a huminové látky. Matrice se účastní počáteční adheze a vyplňuje prostor kolem buněk.

Při tvorbě biofilmu (obrázek 4) dochází k fenotypovým a genotypovým změnám. Organismy vylučují polysacharidovou matrici, která obaluje a chrání nové formy vícevrstvé mikrobiální komunity před imunitním systémem hostitele a biocidy v čistících činidlech (Szczołka-Flynn et al., 2009).



Obrázek 4: Schéma znázorňující strukturu biofilmu (upraveno podle Kvasničková, 2016).

Buňky mikroorganismů rostoucích v biofilmu jsou fyziologicky odlišné od planktonních buněk stejného organismu (Szczołka-Flynn et al., 2010). Bakterie rostoucí ve formě biofilmu mohou být až 1000krát více odolné vůči antibiotické léčbě a dezinfekčním látkám než stejný mikroorganismus rostoucí v planktonické formě (Gilbert et al., 1997).

Za virulentnější kmen mikroba je považován ten, který je schopen tvořit biofilm. Infekce způsobené biofilmopozitivními kmeny jsou perzistentní a obtížně léčitelné. Biofilmy působí jako ložiska, ze kterých se může chorobný proces, infekce, znovu obnovovat (de Nicolas et al., 1995; Arciola et al., 2002; Růžička et al., 2004).

### 3.3.2 Možnosti průkazu biofilmu

Biofilm lze prokázat pomocí metod genotypových a fenotypových. Genotypové metody pro detekci biofilmu jsou založeny na průkazu genů, jejichž produkty se podílejí na tvorbě biofilmu, např. průkaz přítomnosti *ica* operonu u druhu *Staphylococcus epidermidis* (Frebourg et al., 2000).

Agregace buněk a akumulace biofilmu jsou u stafylokoků zprostředkovány produkty chromosomálního genového lokusu, který obsahuje pět genů (*icaA*, *icaB*, *icaD*, *icaC* a represivní *icaR*) organizované v operované struktuře. (Helimann et al., 1996). Každý z těchto genů má svou úlohu v syntéze PIA (polysacharidových intracelulárních adhezínů). Nejvýznačnější úlohu má produkt genu *icaA*, který kóduje transmembránový protein homologický k N-acetyl-glukosaminyltransferáze a genu *icaD*, jehož exprese je nutná pro aktivitu N-acetylglukosaminyltransferázy (Arciola et al., 2001).

Kmeny, které mají v genomu přítomen *ica* operon by měly být považovány za kmeny potenciálně nebezpečné, i když fenotypově schopnost tvorby biofilmu nevykazují. Exprese *ica* operonu u nich může být totiž indukována např. stresem z vnějšího prostředí, což může zvýšit jejich klinický význam (Ziebuhr et al., 1997; Fitzpatrick et al., 2002).

Mezi fenotypové metody patří (1) Christensenova metoda, jejímž principem je obarvení fixované vrstvy buněk v biofilmu krystalovou violetí na dně jamky mikrotitrační destičky nebo zkumavky, a (2) kultivace na agaru s kongo červení, kdy dochází ke specifické vazbě barviva na polysacharidy, které jsou součástí extracelulární polysacharidové substance (EPS) (Frebourg et al., 2000).

Charakteristický růst, rozlišení biofilmopozitivních a biofilmnegativních stafylokoků byl na agaru s kongo červení poprvé popsán ve studii Freeman et al., 1989. Biofilmopozitivní stafylokoci tvoří na tomto agaru černé, suché kolonie s matným povrchem. Biofilmnegativní kmeny rostou v lesklých, hladkých a červeně až červeno-hnědě pigmentovaných koloniích (Růžička et al., 2004).

### 3.3.3 Christensenova metoda

Klasická (nemodifikovaná) Christensenova metoda je založena na kultivaci testovaných mikrobů ve zkumavce. Modifikovaná Christensenova metoda je založena na kultivaci testovaných mikrobů v jamkách mikrotitrační destičky. Obě metody jsou v principu založeny na kultivaci po dobu 24 hodin v trypton-sojovém bujónu či BHI bujónu. Vrstva přichycených mikrobů se barví např. krystalovou violetí, safraninem nebo karbolfuchsinem (Christensen et al., 1982; Mulder et al., 1998).

Christensen et al. 1982 měřili pouze dno jamky mikrotitrační destičky. O 25 let později došlo v rámci studie Stepanovic et al. (2000) k modifikaci, při které bylo barvivo v jamkách resuspendováno v ethanolu a výsledek byl odečítán spektrofotometrem při vlnových délkách 595-620 nm. Výsledkem byla hodnota optické denzity (OD), která odráží akumulaci barviva na fixovaném biofilmu nejen na dně jamky, ale i na její stěně, což vedlo k zpřesnění této metody. Výsledek se porovnává s tzv. *cut off value*, která je vypočítána na základě OD negativní kontroly. Pokud jsou hodnoty kmenů vyšší, než je *cut off value*, označují se za biofilmopozitivní a v případě hodnoty nižší než *cut off value*, biofilmnegativní.

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Přístroje a vybavení

V experimentální části bakalářské práce byly použity následující přístroje a software:

- absorbanční (ELISA) reader ELx808 (BioTek)
- autokláv DE (Systec)
- box laminární HERAsafe KS 12 Biohazard (ThermoScientific)
- centrifuga Spectrafuge 24D (Labnet)
- hlubokomrazicí box ULUF (Arctiko)
- lednička
- LightCycler 96 (Roche)
- LightCycler Roche software version 1.01.000045 (Roche)
- MALDI ToF hmotnostní spektrometr Microflex LT Systém (Bruker)
- minicentrifuga (FastGene)
- mraznička
- Revelation software version 4.25 (Dynex)
- termoblok TS-100 (Biosan)
- termostat Incucell 55 (BMT)
- vortex v1 (Biosan)

V experimentální části bakalářské práce bylo použito následující vybavení laboratoře a plasty:

- automatické pipety a příslušné sterilní špičky 0,5-10  $\mu$ l, 1-10  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l (Finnpipette)
- bakteriologické kličky 1 $\mu$ l (Biologix)
- lahve na autoklávování o objemu 500 ml (Duran)
- LightCycler® 8-Tube Strips (white) (Roche)
- MALDI destička z leštěné oceli pro nanášení vzorku MSP 96 (Bruker)
- mikrotitrační destička P (Gama group)
- mikrozkušavky typu Eppendorf o objemu 1,5 ml (Eppendorf)
- parafilm (Pechiney)
- stojánky na mikrozkušavky (Biologix)

## 4.2 Použité chemikálie

- acetonitril (kat. č. 10120-11000, Penta)
- BHI bujón (kat. č. M210, Hi-Media)
- destilovaná voda
- disky pro testování citlivosti k antibiotikům – oxacilin 1 µg (kat. č. 66888, Bio-Rad)
- ethanol absolutní p.a. (kat. č. 71250-11000, Penta)
- glukosa (Lékárna FNOL)
- krevní agar (kat. č. PO0537, Oxoid)
- kryobanka B (kat. č. PP64, ITEST)
- krystalová violeť (kat. č. 28290-30100, Penta)
- kyselina mravenčí (kat. č. F0507, Sigma-Aldrich)
- methylalkohol p.a. (kat. č. 21210-11000, Penta)
- qPCR 2x SYTO-9 (kat. č. P593; Top-Bio)
- Sabouraudův agar s chloramfenikolem a gentamycinem (kat. č. PO0358, Oxoid)
- šťavelan amonný p.a. (kat. č. 26750-30500, Penta)
- trifluoroctová kyselina (kat. č. T6508, Sigma-Aldrich)
- α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (kat. č. C8982, Sigma-Aldrich)

## 4.3 Použité roztoky

- Příprava BHI (*Brain-Heart-Infusion*) bujónu: 37 g BHI na 1 l destilované vody, sterilizace autoklávováním
- Příprava BHI s 0,25 % příměsí glukosy: 2,5 g glukosy a 37 g BHI na 1 l destilované vody, sterilizace autoklávováním
- Příprava zásobního roztoku krystalové violeti: bylo smícháno 5 g krystalové violeti s 200 ml 99% ethanolu
- Příprava 1% krystalové violeti: 40 ml zásobního roztoku krystalové violeti bylo smícháno s 60 ml šťavelanu amonného
- Příprava 70% ethanolu: 700 ml ethanolu bylo smícháno s 300 ml H<sub>2</sub>O a promícháno
- Příprava 70% kyseliny mravenčí (*Formic acid*): k 700 µl kyseliny mravenčí bylo přidáno 300 µl H<sub>2</sub>O (kyselina do vody) a promícháno
- Příprava 1 ml organického rozpouštědla (OR): 500 µl acetonitrilu (AN) bylo smícháno s 475 µl H<sub>2</sub>O a 25 µl kyseliny trifluoroctové (TFA)

- Pro naředění matrice  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA): bylo použito 250  $\mu$ l OR, obsah byl důkladně protřepán

#### 4.4 Dotazník

Na základě literární rešerše byl vytvořen dotazník (příloha 1) k rozšíření informací o daném dobrovolníkovi, jeho pohlaví, věku, materiálu, který byl poskytnut (stěr z brýlových čoček/kontaktní čočky). Dotazník byl rozdán padesáti respondentů (25 respondentů bylo nositeli brýlí a 25 bylo nositeli kontaktních čoček). V případě nošení kontaktních čoček byl zjišťován způsob zacházení s nimi (čištění kontaktních čoček, výměna roztoku atd.), přenášení nebo případné potíže při nošení. Vyplněné dotazníky byly zpracovány a získané informace byly zohledněny a vztaheny k získaným výsledkům odebraných vzorků.

#### 4.5 Sběr materiálu

Vnitřní strana obou brýlových čoček byla důkladně setřena sterilním vatovým tamponem na špejli zvlhčeným fyziologickým roztokem pro lepší záchyt mikroorganismů. Tímto tamponem byla inokulována zkumavka se 4 ml BHI bujónu. Dobrovolníci s kontaktními čočkami, po umytí rukou, vyjmuli kontaktní čočky z oka a vložili je přímo do zkumavky se 4 ml BHI bujónu. Všechny vzorky byly inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 16-24 hodin.

#### 4.6 Kultivace

Pipetou bylo přeneseno 100  $\mu$ l homogenizované bakteriální suspenze po 24 hodinové inkubaci při 37 °C na krevní agar a Sabouraudův agar s chloramfenikolem a gentamycinem. Na krevním agaru bylo inokulum rozočkováno křížovým roztěrem a na Sabouraudově agaru byl vytvořen masivní roztěr.

Krevní agar byl inkubován při 37 °C po dobu 16-24 hodin pro záchyt bakterií. Sabouraudův agar byl zatáhnut parafilmem a kultivován až 10 dní při teplotě 30 °C pro záchyt kvasinek a plísní. Parafilm byl použit z důvodu zabránění vyschnutí při delší kultivaci a v případě vykultivování plísní, aby nedošlo ke kontaminaci okolí po vysporulování.

Vykultivované mikroorganismy byly izolovány do tzv. čisté kultury, identifikovány a zamraženy při -80 °C. Pro zamražení byla použita ITEST kryobanka B.

## 4.7 Metoda MS MALDI ToF

Pomocí bambusového párátko byla na každou pozici MALDI destičky nanášena jedna čistá kolonie ze vzorku. Po zaschnutí byly nanášené kolonie převrstveny 1 µl 70% kyseliny mravenčí. Poté bylo nanášeno 0,75 µl roztoku matrice HCCA. Na každý vzorek byla použita nová špička. Po zaschnutí matrice byla MALDI destička vložena do přístroje Microflex LT od firmy Bruker, kde byla změřena hmotnostní spektra. Podle referenční databáze lze porovnat, a tak identifikovat mikroorganismy nacházející se ve vzorku.

Laser MS MALDI ToF ozáří nanosekundovým pulsem vzorky s matricí, matrice absorbuje energii pulsu a její rozklad ionizuje molekuly vzorku. Pozitivně nabitě ionty jsou pak na krátkou vzdálenost urychleny silným elektrickým polem a vstupují do vakua v trubici detektoru, kde se pohybují rychlostí úměrnou jejich hmotnosti a náboje. Výstupem srovnávacího algoritmu je druhová identifikace mikroorganismu s přiřazenou hodnotou skóre. Toto skóre vyjadřuje shodu hmotnostního spektra analyzovaného vzorku s referenčním molekulárním identifikátorem v databázi MALDI Biotyper.

Po použití byla MALDI destička očištěna pro další použití. Destička byla vložena do Petriho misky a její povrch byl překryt 70% ethanolem, který se nechal působit po dobu 5 minut. Destička byla následně intenzivně opláchnuta pod tekoucí horkou vodou a důkladně otřena ubrouskem navlhčeným 70% ethanolem. Poté byla destička opět oplachována horkou vodou a zároveň otírána ubrouskem. V digestoři a za použití ochranných pomůcek byla destička překryta 0,85 µl 80% kyseliny trifluoroctové (TFA) a ubrouskem byly intenzivně otřeny všechny pozice na destičce. Nakonec byla destička opláchnuta destilovanou vodou a vysušena ubrouskem.

## 4.8 Modifikovaná Christensenova metoda

Pomocí modifikované Christensenovy metody byla prokazována tvorba biofilmu. Tato metoda je založena na kultivaci testovaného mikroba v jamkách mikrotitrační destičky.

Bylo provedeno vyočkování z kryoškumavek sterilní bakteriologickou kličkou na krevní agar, inkubace v termostatu probíhala při 37 °C po dobu 24 hodin. Byla připravena suspenze do zkumavek s 1,5 ml BHI bujónu s 0,25% příměsí glukosy. Suspenze byla homogenizována na vortexu. Do jamek mikrotitrační destičky typu P bylo napipetováno 200 µl suspenze dle schématu. Destičky byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Pro odstranění volných buněk byla destička velmi opatrně promyta vodou. Následovala fixace 100 µl 99% methanolu po dobu 15 minut. Methanol byl odsát a destička byla vložena do termostatu pro rychlejší vyschnutí. Po vysušení bylo

napipetováno 100 µl 1% krystalové violeti pro obarvení fixované vrstvy biofilmu. Barvení probíhalo 10 minut. Krystalová violet byla odsáta a destička byla důkladně promyta vodou. Zbytky vody byly vyklepány do buničiny. Do každé jamky bylo napipetováno 100 µl 33% kyseliny octové a destička byla vložena na třepačku. Vzorky byly měřeny na fotometru při 570 nm proti blanku (čistý BHI).

Pomocí softwaru Revelation 4.25 byly vzorky vyhodnoceny, dle rovnic (tabulka 2), jako -/+/++/+++, kdy dle zvyklosti sérologické laboratoře Ústavu mikrobiologie FN Olomouc a LF UP byly vzorky s výsledky -/+/++ vyhodnoceny jako biofilmnegativní a +++ jako biofilmpozitivní.

Tabulka 2: Spektrofotometrické vyhodnocení modifikované Christensenovy metody.

| Hodnocení | Rovnice           |
|-----------|-------------------|
| +++       | $4*(NC+3*SD(NC))$ |
| ++        | $2*(NC+3*SD(NC))$ |
| +         | $NC+3*SD(NC)$     |
| -         | $NC+3*SD(NC)$     |

Legenda: NC – negative control (negativní kontrola); SD – směrodatná odchylka

## 4.9 Izolace DNA

Do mikrozkuhavky typu Eppendorf o objemu 1,5 ml bylo napipetováno 50 µl sterilní destilované vody, k tomu byly přidány 2-3 kolonie pomocí sterilní bakteriologické kličky. Suspenze byla důkladně homogenizována na vortexu a inkubována v termobloku při 94 °C po dobu 10 minut. Po inkubaci byly vzorky lehce zvortexovány a následně centrifugovány při 13000 g po dobu 1 min. Supernatant byl přepipetován do nové mikrozkuhavky, důkladně označen a zamražen při -20 °C pro další analýzy.

## 4.10 PCR

U stafylokoků byla provedena real-time PCR pro detekci genu *mecA*. Pro vyhodnocení byl použit Lightcycler96 software verze 1.01.000045, kdy byla použita analýza *Tm calling* pro stanovení hodnoty teploty tání ( $T_m$ ; *melting temperature*) PCR produktu. Pro amplifikaci specifického PCR produktu byly použity primery *mecA\_R* 5'-ACAGTCGCTACGAAAAGAAA-3' a *mecA\_F* 5'-GGAAATGCCATAATGACAAG-3', které byly převzaty z Arciola et al., 2002.



Do mikrozkušavky typu Eppendorf o objemu 1,5 ml byl vytvořen premix (tabulka 3). Po přidání všech reagensů byla směs lehce stočena na centrifuze. Do stripů o 8 jamkách bylo napipetováno 9  $\mu$ l přichystaného premixu a 1  $\mu$ l templátové DNA. Na termocykleru LightCycler 96 (Roche) byl nastaven PCR program (tabulka 4). Ihned po PCR následovala analýza tání v rozmezí teplot 70-90°C. Teplota tání (*melting temperature*), je taková teplota, při které právě polovina duplexu DNA disociuje do jednovláknové formy.

Tabulka 3: Složení PCR směsi na jednu PCR reakci.

| Látka            | Objem [ $\mu$ l] | Konečná koncentrace |
|------------------|------------------|---------------------|
| master Mix       | 4,5              | 1 $\times$          |
| H <sub>2</sub> O | 4,3              | -                   |
| primer F         | 0,1              | 0,5 $\mu$ M         |
| primer R         | 0,1              | 0,5 $\mu$ M         |
| templátová DNA   | 1                | nebylo měřeno       |

Tabulka 4: Schéma real-time PCR reakce.

| Proces               | °C | Čas   | Počet cyklů |
|----------------------|----|-------|-------------|
| Počáteční denaturace | 94 | 5 min | 1           |
| Denaturace           | 92 | 30 s  | 35          |
| Nasedání primerů     | 55 | 30 s  |             |
| Extenze              | 72 | 30 s  |             |
| Konečná extenze      | 72 | 60 s  | 1           |

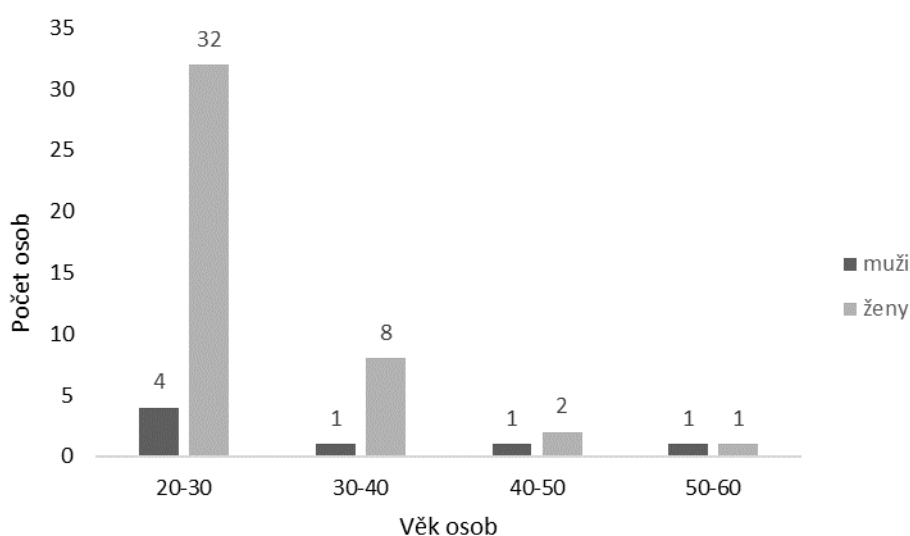
#### 4.11 Difúzní disková metoda

U pozitivních izolátů na gen *mecA* byla stanovena difúzní diskovou metodou rezistence k oxacilinů. Na krevní agar byly bakteriologickou kličkou masivně vyočkovány izoláty *mecA+*. Po inokulaci byl položen disk napuštěný oxacilinem (1 $\mu$ g). Kultivace probíhala po dobu 24 hodin při 37 °C. Po inkubaci byl změřen průměr inhibiční zóny. Hodnota hraniční zóny, tzv. *breakpoint*, pro stanovení, zda je daný kmen citlivý nebo rezistentní, byla převzata ze směrnice EUCAST (*bacteria v 9.0*), kde byla uvedena hraniční zóna 20 mm. Izoláty se zónou inhibice  $\geq 20$  mm byly vyhodnoceny jako citlivé a  $< 20$  mm jako rezistentní (převzato z <http://www.eucast.org/>, *Clinical breakpoints – bacteria (v 9.0)*, staženo 1. leden, 2019).

## 5. Výsledky

### 5.1 Vyhodnocení dotazníků

Od dvaceti pěti dobrovolníků byly sesbírány kontaktní čočky a dalších dvaceti pěti dobrovolníků poskytlo brýlové čočky ke stěru. Získané informace z dotazníků byly vyhodnoceny. Bylo zjištěno početní zastoupení mužů a žen, kteří byli dále rozděleni do věkových kategorií (obrázek 5). Z odebraných vzorků kontaktních čoček bylo 20 měkkých měsíčních a 5 měkkých denních.



Obrázek 5: Pohlaví a věku respondentů.

Dále byly zkoumány obtíže při nošení kontaktních čoček, kdy 44 % (11/25) respondentů nosících kontaktní čočky trpělo obtížemi jako je např. vysychání, pálení nebo řezání očí. S tím souviselo i přenášení kontaktních čoček, kdy 56 % (14/25) respondentů kontaktní čočky přenášelo. Respondenti, kteří čočky nepřenášeli, většinou netrpěli žádnými obtížemi.

Také záleželo na hygieně, kterou je nutno dodržovat v případě nasazování, vydělávání, čištění a skladování čoček. Pouze 24 % (6/25) respondentů provádělo manuální čištění kontaktních čoček, zbylí čočky pouze oplachovali roztokem pro kontaktní čočky.

Z 25 sesbíraných vzorků kontaktních čoček bylo vykultivováno 52 izolátů a z 25 vzorků brýlových čoček 57 izolátů. Největší procentuální podíl z vykultivovaných izolátů představovali zástupci rodu *Staphylococcus* a to 74,31 % (81/109).

## 5.2 Mikrobiom

Každý odebraný vzorek byl primárně kultivován v BHI bujónu, který byl následně vyočkován na krevní agar pro kultivaci bakterií a Sabouraudův agar s chloramfenikolem a gentamycinem pro kultivaci kvasinek a plísní. Z celkem padesáti vzorků bylo vykultivováno 108 izolátů bakterií a 1 zástupce kvasinek. Z dvaceti pěti vzorků kontaktních čoček bylo vykultivováno 52 izolátů a z dvaceti pěti stěrů z brýlových čoček bylo vykultivováno 56 bakteriálních izolátů a 1 izolát identifikovaný jako *Candida famata* (tabulka 5).

Tabulka 5: Vykultivované izoláty.

| Vzorek | Typ čoček     |                 | Rod                    | Druh               |
|--------|---------------|-----------------|------------------------|--------------------|
|        | Brýlové čočky | Kontaktní čočky |                        |                    |
| 1      |               | x               | <i>Staphylococcus</i>  | <i>warneri</i>     |
| 2      | x             |                 | <i>Staphylococcus</i>  | <i>capitis</i>     |
|        |               |                 |                        | <i>epidermidis</i> |
| 3      | x             |                 | <i>Staphylococcus</i>  | <i>hominis</i>     |
|        |               |                 |                        | <i>capitis</i>     |
| 4      | x             |                 | <i>Micrococcus</i>     | <i>epidermidis</i> |
|        |               |                 |                        | <i>luteus</i>      |
| 5      | x             |                 | <i>Staphylococcus</i>  | <i>epidermidis</i> |
|        |               |                 |                        | <i>warneri</i>     |
| 6      | x             |                 | <i>Corynebacterium</i> | <i>amycolatum</i>  |
|        |               |                 |                        | <i>oralis</i>      |
| 7      | x             |                 | <i>Streptococcus</i>   | <i>epidermidis</i> |
|        |               |                 |                        | <i>hominis</i>     |
| 8      | x             |                 | <i>Staphylococcus</i>  | <i>warneri</i>     |
|        |               |                 |                        | <i>epidermidis</i> |
| 9      | x             |                 | <i>Staphylococcus</i>  | <i>hominis</i>     |
|        |               |                 |                        | <i>aureus</i>      |
| 9      | x             |                 | <i>Staphylococcus</i>  | <i>epidermidis</i> |
|        |               |                 |                        | <i>mojavensis</i>  |
|        |               |                 | <i>Bacillus</i>        | <i>subtilis</i>    |
|        |               |                 |                        | <i>valismortis</i> |

Tabulka 5: Vykultivované izoláty – pokračování.

| Vzorek | Typ čoček     |                 | Rod                   | Druh                 |
|--------|---------------|-----------------|-----------------------|----------------------|
|        | Brýlové čočky | Kontaktní čočky |                       |                      |
|        |               |                 |                       | <i>cohnii</i>        |
|        |               |                 | <i>Staphylococcus</i> | <i>hominis</i>       |
|        |               |                 | <i>Staphylococcus</i> | <i>warneri</i>       |
| 10     |               | ×               |                       | <i>epidermidis</i>   |
| 11     |               | ×               | <i>Streptococcus</i>  | <i>haemolyticus</i>  |
|        |               |                 |                       | <i>oralis</i>        |
|        |               |                 | <i>Rothia</i>         | <i>salivarius</i>    |
|        |               |                 |                       | <i>mucilaginoso</i>  |
| 12     |               | ×               | <i>Staphylococcus</i> | <i>aureus</i>        |
|        |               |                 |                       | <i>warneri</i>       |
|        |               |                 |                       | <i>epidermidis</i>   |
| 13     | ×             |                 | <i>Staphylococcus</i> | <i>gordonii</i>      |
|        |               |                 | <i>Streptococcus</i>  | <i>dentocariosa</i>  |
|        |               |                 | <i>Rothia</i>         |                      |
| 14     | ×             |                 | <i>Staphylococcus</i> | <i>warneri</i>       |
| 15     |               | ×               | <i>Staphylococcus</i> | <i>epidermidis</i>   |
| 16     | ×             |                 | <i>Staphylococcus</i> | <i>epidermidis</i>   |
| 17     | ×             |                 | <i>Staphylococcus</i> | <i>epidermidis</i>   |
|        |               |                 | <i>Pseudomonas</i>    | <i>stutzeri</i>      |
|        |               |                 |                       | <i>epidermidis</i>   |
| 18     | ×             |                 | <i>Staphylococcus</i> | <i>lugdunensis</i>   |
|        |               |                 |                       | <i>warneri</i>       |
| 19     | ×             |                 | <i>Staphylococcus</i> | <i>warneri</i>       |
|        |               |                 | <i>Staphylococcus</i> | <i>warneri</i>       |
| 20     | ×             |                 | <i>Bacillus</i>       | <i>licheniformis</i> |
|        |               |                 |                       | <i>haemolyticus</i>  |
|        |               |                 | <i>Staphylococcus</i> | <i>pumilus</i>       |
| 21     | ×             |                 | <i>Bacillus</i>       | <i>stutzeri</i>      |
|        |               |                 | <i>Pseudomonas</i>    | <i>famata</i>        |
|        |               |                 | <i>Candida</i>        |                      |
| 22     | ×             |                 | <i>Staphylococcus</i> | <i>epidermidis</i>   |
|        |               |                 | <i>Bacillus</i>       | <i>licheniformis</i> |
| 23     |               | ×               | <i>Staphylococcus</i> | <i>epidermidis</i>   |

Tabulka 5: Vykultivované izoláty – pokračování.

| Vzorek | Typ čoček     |                 | Rod  | Druh  |
|--------|---------------|-----------------|--|---|
|        | Brýlové čočky | Kontaktní čočky |  |   |
| 24     |               | x               | <i>Staphylococcus</i>                          | <i>epidermidis</i><br><i>pasteuri</i><br><i>warneri</i>       |
| 25     | x             |                 | <i>Staphylococcus</i><br><i>Staphylococcus</i> | <i>epidermidis</i><br><i>aureus</i>                           |
| 26     | x             |                 | <i>Bacillus</i><br><i>Leclercia</i>            | <i>cereus</i><br><i>adecarboxylata</i>                        |
| 27     | x             |                 | <i>Staphylococcus</i><br><i>Bacillus</i>       | <i>epidermidis</i><br><i>pumilus</i>                          |
| 28     | x             |                 | <i>Staphylococcus</i>                          | <i>epidermidis</i><br><i>pasteuri</i>                         |
| 29     | x             |                 | <i>Staphylococcus</i><br><i>Bacillus</i>       | <i>epidermidis</i><br><i>licheniformis</i>                    |
| 30     | x             |                 | <i>Staphylococcus</i><br><i>Staphylococcus</i> | <i>epidermidis</i><br><i>warneri</i><br><i>epidermidis</i>    |
| 31     |               | x               | <i>Bacillus</i>                                | <i>warneri</i><br><i>pumilus</i><br><i>aureus</i>             |
| 32     |               | x               | <i>Staphylococcus</i>                          | <i>epidermidis</i>  |
| 33     | x             |                 | <i>Staphylococcus</i><br><i>Bacillus</i>       | <i>haemolyticus</i><br><i>licheniformis</i><br><i>capitis</i> |
| 34     |               | x               | <i>Staphylococcus</i>                          | <i>epidermidis</i><br><i>haemolyticus</i>                     |
| 35     |               | x               | <i>Staphylococcus</i>                          | <i>epidermidis</i><br><i>warneri</i>                          |
| 36     |               | x               | <i>Staphylococcus</i>                          | <i>pasteuri</i><br><i>warneri</i><br><i>aureus</i>            |
| 37     |               | x               | <i>Staphylococcus</i>                          | <i>epidermidis</i>  |

Tabulka 5: Vykultivované izoláty – pokračování.

| Vzorek | Typ čoček     |                 | Rod   | Druh   |
|--------|---------------|-----------------|---|--|
|        | Břílové čočky | Kontaktní čočky |   |  |
| 38     |               | ×               | <i>Staphylococcus</i>                         | <i>aureus</i><br><i>epidermidis</i>                |
| 39     |               | ×               | <i>Staphylococcus</i>                         | <i>cohnii</i><br><i>epidermidis</i>                |
| 40     | ×             |                 | <i>Staphylococcus</i>                         | <i>capitis</i><br><i>epidermidis</i>               |
| 41     |               | ×               | <i>Staphylococcus</i>                         | <i>epidermidis</i>                                 |
| 42     |               | ×               | <i>Staphylococcus</i>                         | <i>epidermidis</i><br><i>haemolyticus</i>          |
| 43     |               | ×               | <i>Staphylococcus</i>                         | <i>pasteuri</i><br><i>warneri</i>                  |
| 44     |               | ×               | <i>Staphylococcus</i>                         | <i>epidermidis</i><br><i>warneri</i>               |
| 45     |               | ×               | <i>Staphylococcus</i>                         | <i>epidermidis</i>                                 |
| 46     |               | ×               | <i>Streptococcus</i>                          | <i>oralis</i><br><i>salivarius</i>                 |
| 47     |               | ×               | <i>Staphylococcus</i>                         | <i>epidermidis</i>                                 |
| 48     |               | ×               | <i>Staphylococcus</i><br><i>Streptococcus</i> | <i>warneri</i><br><i>parasanguinis</i>             |
| 49     |               | ×               | <i>Staphylococcus</i>                         | <i>cohnii</i><br><i>epidermidis</i>                |
| 50     |               | ×               | <i>Staphylococcus</i><br><i>Streptococcus</i> | <i>pasteuri</i><br><i>warneri</i><br><i>oralis</i> |

Mikrobiota kontaktních a brýlových čoček se lišily, na kontaktních čočkách bylo vykultivováno méně rodů, dá se předpokládat, že na brýlích bylo více rodů proto, že brýle jsou méně čištěny antibakteriálními prostředky. Jak z brýlových, tak z kontaktních čoček byly vykultivováni zástupci rodů *Bacillus*, *Rothia*, *Staphylococcus* a *Streptococcus*. *Staphylococcus aureus* patřící mezi nejběžnější patogeny, byl vykultivován jak na brýlových, tak na kontaktních čočkách.

Převážná většina vykultivovaných mikroorganismů je součástí normální mikroflóry kůže (např. *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. epidermidis* a *S. warneri*). Některé izoláty náležely zástupcům fyziologické flóry dutiny ústní (např. *Rothia dentocariosa*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*). Byly také vykultivovány mikroorganismy, které nejsou součástí fyziologické mikroflóry kůže a ani dutiny ústní. Na brýlových čočkách byly zachyceny patogenní mikroorganismy *Pseudomonas stutzeri* a *Candida famata*. Tyto mikroorganismy se ovšem na brýlovou čočku dostaly z prostředí.

Z jednoho vzorku kontaktních čoček byl vykultivován *Bacillus pumilus*, který by se neměl dostat do kontaktu s okem, značí to nedostatečnou hygienu při zacházení s kontaktními čočkami.

### 5.3 Schopnost tvorby biofilmu

Dále byla dokazována schopnost mikroorganismů tvořit biofilm pomocí modifikované Christensenovy metody. Pomocí spektrofotometru byl hodnocen nárůst biofilmu na stěnách a dně jamek mikrotitrační destičky (tabulka 6 a 7). Z izolátů získaných z kontaktních čoček bylo biofilmopozitivních 53,85 % (28/52), z brýlových čoček 71,93 % (41/57).

Tabulka 6: Schopnost růstu izolátů ve formě biofilmu u brýlových čoček.

| Rod                    | Druh                  | Číslo izolátu | Vyhodnocení dle absorbance | Konečné vyhodnocení |
|------------------------|-----------------------|---------------|----------------------------|---------------------|
| <i>Bacillus</i>        | <i>cereus</i>         | 64            | ++                         | -                   |
|                        | <i>licheniformis</i>  | 45            | ++                         | -                   |
|                        | <i>licheniformis</i>  | 51, 70, 79    | +++                        | +                   |
|                        | <i>mojavensis</i>     | 27            | ++                         | -                   |
|                        | <i>pumilus</i>        | 48            | +++                        | +                   |
|                        | <i>pumilus</i>        | 66            | -                          | -                   |
|                        | <i>subtilis</i>       | 25            | +++                        | +                   |
|                        | <i>valismortis</i>    | 26            | +++                        | +                   |
| <i>Candida</i>         | <i>famata</i>         | 49            | ++                         | -                   |
| <i>Corynebacterium</i> | <i>amycolatum</i>     | 17            | +++                        | +                   |
| <i>Leclercia</i>       | <i>adecarboxylata</i> | 63            | ++                         | -                   |
| <i>Micrococcus</i>     | <i>luteus</i>         | 9             | +++                        | +                   |
| <i>Pseudomonas</i>     | <i>stutzeri</i>       | 38,39         | ++                         | -                   |

Tabulka 6: Schopnost růstu izolátů ve formě biofilmu u brýlových čoček – pokračování.

| Rod                   | Druh                | Číslo izolátu   | Vyhodnocení dle absorpance | Konečné vyhodnocení |
|-----------------------|---------------------|---|----------------------------|---------------------|
|                       | <i>stutzeri</i>     | 61  | +++                        | +                   |
| <i>Rothia</i>         | <i>dentocariosa</i> | 30  | -                          | -                   |
| <i>Staphylococcus</i> | <i>aureus</i>       | 18, 62  | +++                        | +                   |
|                       | <i>capitis</i>      | 2,5   | + / ++                     | -                   |
|                       | <i>capitis</i>      | 91  | +++                        | +                   |
|                       | <i>epidermidis</i>  | 23,92   | + / ++                     | -                   |
|                       | <i>epidermidis</i>  | 4, 6, 7, 10, 13, 15,<br>19, 37, 40, 42, 50,<br>56, 65, 68, 69, 72 | +++                        | +                   |
|                       | <i>haemolyticus</i> | 78  | ++                         | -                   |
|                       | <i>haemolyticus</i> | 47  | +++                        | +                   |
|                       | <i>hominis</i>      | 3, 12, 16   | +++                        | +                   |
|                       | <i>lugdunensis</i>  | 41  | +++                        | +                   |
|                       | <i>pasteuri</i>     | 67  | +++                        | +                   |
|                       | <i>warneri</i>      | 44  | -                          | -                   |
|                       | <i>warneri</i>      | 11, 14, 35, 43, 46,<br>71   | +++                        | +                   |
| <i>Streptococcus</i>  | <i>oralis</i>       | 8   | +++                        | +                   |
| <i>Streptococcus</i>  | <i>gordonii</i>     | 31  | -                          | -                   |

Legenda: vyhodnocení +++ jako pozitivní (+), - / + / ++ jako negativní (-)

Tabulka 7: Schopnost růstu izolátů ve formě biofilmu u kontaktních čoček.

| Rod                   | Druh                | Číslo izolátu            | Vyhodnocení dle absorpance | Konečné vyhodnocení |
|-----------------------|---------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------|
| <i>Bacillus</i>       | <i>pumilus</i>      | 74                       | +                          | -                   |
| <i>Rothia</i>         | <i>mucilaginoso</i> | 34                       | ++                         | -                   |
| <i>Staphylococcus</i> | <i>aureus</i>       | 32, 77, 86, 89           | +++                        | +                   |
|                       | <i>capitis</i>      | 80                       | +++                        | +                   |
|                       | <i>cohnii</i>       | 58, 109, 114             | + / ++                     | -                   |
|                       | <i>epidermidis</i>  | 93, 94, 102, 103,<br>108 | - / + / ++                 | -                   |



Tabulka 7: Schopnost růstu izolátů ve formě biofilmu u kontaktních čoček – pokračování.

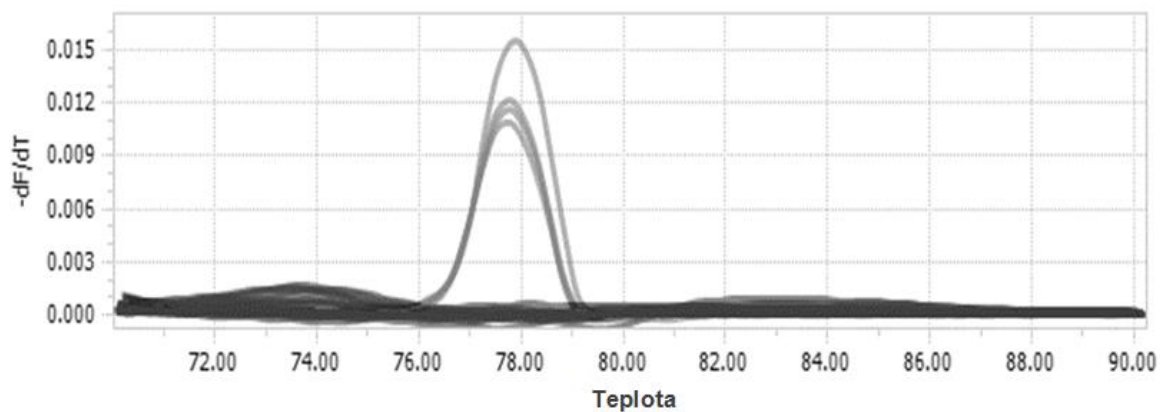
| Rod                  | Druh                 | Číslo izolátu   | Vyhodnocení<br>dle absorbance | Konečné<br>vyhodnocení |
|----------------------|----------------------|---|-------------------------------|------------------------|
| <i>Streptococcus</i> | <i>epidermidis</i>   | 22, 36, 52, 54, 75,<br>76, 82, 84, 85, 87,<br>90, 106 | +++                           | +                      |
|                      | <i>haemolyticus</i>  | 95  | +                             | -                      |
|                      | <i>haemolyticus</i>  | 20, 81  | +++                           | +                      |
|                      | <i>hominis</i>       | 59  | +++                           | +                      |
|                      | <i>pasteuri</i>      | 97, 99, 110   | + / ++                        | -                      |
|                      | <i>pasteuri</i>      | 53  | +++                           | +                      |
|                      | <i>warneri</i>       | 73, 98, 100, 101,<br>107, 111                         | + / ++                        | -                      |
|                      | <i>warneri</i>       | 1, 33, 55, 57, 83                                     | +++                           | +                      |
|                      | <i>oralis</i>        | 112   | ++                            | -                      |
|                      | <i>oralis</i>        | 21, 105   | +++                           | +                      |
|                      | <i>salivarius</i>    | 29, 104   | + / ++                        | -                      |
|                      | <i>parasanguinis</i> | 113   | ++                            | -                      |

Legenda: vyhodnocení +++ jako pozitivní (+), - / ++ jako negativní (-)

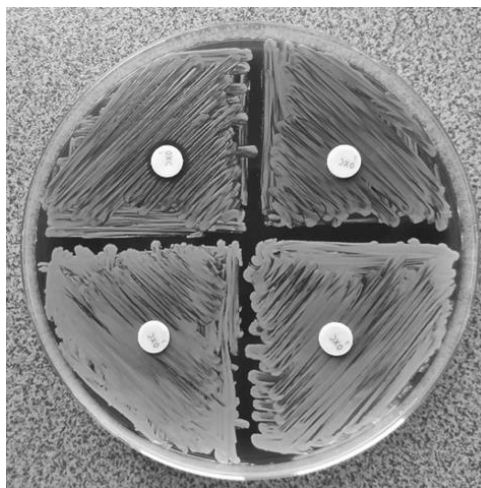
#### 5.4 Detekce rezistence k methicilinu

Pomocí real-time PCR se specifickými primery pro gen *mecA* byla detekována přítomnost genu *mecA*, který kóduje rezistenci k methicilinu. Byly zjištěny 4 izoláty, které byly *mecA* pozitivní (obrázek 6), konkrétně šlo o 2 izoláty náležející k druhu *Staphylococcus haemolyticus* (číslo izolátu 20, 95) a 2 izoláty *Staphylococcus epidermidis* (číslo izolátu 82, 84). Pro izoláty *mecA*<sup>+</sup> byla stanovena průměrná hodnota teploty tání ( $T_m$ ) a směrodatná odchylka (SD),  $77,5\text{ °C} \pm 0,1625$ .

Pomocí diskové difúzní metody byla rezistence k methicilinu ověřena fenotypově. Všechny čtyři izoláty rostly až antibiotickým diskům pro stanovení citlivosti k antibiotikům, inhibiční zóna byla rovna nule a byly tedy rezistentní k oxacilinu, respektive methicilinu (obrázek 7).



Obrázek 6: Výsledek analýzy *Tm Calling*. Šedé křivky představují geny *mecA+*, černé křivky *mecA-*.



Obrázek 7: Výsledek diskové difúzní metody pro izoláty *Staphylococcus haemolyticus* (číslo izolátu 20, 95) a *Staphylococcus epidermidis* (číslo izolátu 82, 84).

## 6. Závěr

Teoretická část práce byla zaměřena na lidský mikrobiom, se zaměřením na mikrobiom kůže a oka, a dále na metody identifikace mikroorganismů a biofilm.

V praktické části byly splněny všechny cíle, které byly na začátku práce zadány. Experimentální část práce zahrnovala sestavení dotazníků a jejich následné vyhodnocení, sběr biologického materiálu (stěry z brýlových čoček a kontaktní čočky), který sloužil pro zhodnocení mikrobiomu, tedy výskytu bakterií, kvasinek a plísní na brýlových a kontaktních čočkách.

Dotazníky, byly vyplněny padesáti respondenty, kteří poskytli materiál. Z těchto dotazníků byly zjištěny informace, jako je pohlaví, věk, poskytnutý materiál (kontaktní, brýlové čočky), a také se kladl důraz na informace ohledně péče o kontaktní čočky. Bylo vypočítáno procentuální zastoupení osob, které trpěly obtížemi (např. pálení, řezání očí), přenášely kontaktní čočky atd.

Mikroorganismy byly vykultivovány pomocí kultivace na krevním a Sabouraudově agaru s chloramfenikolem a gentamycinem za daných kultivačních podmínek. Vykultivované izoláty byly identifikovány metodou MS MALDI ToF. Jak na brýlových, tak i na kontaktních čočkách bylo nalezeno velké množství mikroorganismů. Velká většina identifikovaných organismů se řadí do běžné mikroflóry. Kromě těchto organismů, které jsou součástí fyziologické mikroflóry, bylo vykultivováno pár mikroorganismů, které nejsou součástí mikroflóry kůže ani oka a mohou se podílet na infekci oka.

Na brýlové čočky se mohou mikroorganismy dostat i z prostředí. Množství a zastoupení mikroorganismů na kontaktních čočkách poukazují na hygienu, která je nebo není dodržována při manipulaci s kontaktními čočkami.

## 7. Diskuse

Do studie v rámci předložené bakalářské práce bylo zahrnuto celkem 50 respondentů, 25 bylo nositeli brýlových čoček a 25 kontaktních čoček. Bylo zjištěno, že na brýlových čočkách se mimo zástupce fyziologické kožní mikroflóry usazují také mikroorganismy z prostředí, ve kterém se daný jedinec vyskytuje, např. *Bacillus valismortis*, *Bacillus mojavensis*. Z hygienického hlediska je potřeba čistit jak brýlové čočky, tak i obroučky a nosní vložky. Ve většině případů brýlové čočky kolonizované mikroorganismy lidské oko neovlivní, nedochází k infekci ani jiným zdravotním obtížím.

U lidí pracujících ve zdravotnictví (zejména chirurgové, jelikož mikroorganismy vyskytující se na brýlích mohou např. kontaminovat ránu pacienta na sále) hrozí kolonizace brýlí patogenními bakteriemi, zahrnující i nozokomiální kmeny, které bývají často multirezistentní.

Ve studii Butt et al. (2012) byla řešena problematika brýlí jako zdroj chirurgických infekcí. Kontaminace může být způsobena přímým kontaktem brýlí s ranou (pádem brýlí přímo do rány), nebo nepřímým kontaktem (dotyk prsty brýlí během operace nebo postříkání biologickým materiálem, které mohlo zasáhnout brýle a zpětně infikovat ránu). Z uvedeného důvodu by měla být prováděna desinfekce u brýlí chirurgů. Tomuto přenosu infekce lze zabránit používáním ochranné masky nebo přilby.

V rámci studie Butt et al. (2012) bylo sesbíráno 20 brýlí od chirurgů. Stěry nosních vložek a nožiček byly provedeny sterilní vatovou tyčinkou namočenou v sterilní destilované vodě. První den byl každý tampon vložen do bujónu a inkubován 24 hodin při 36 °C. Druhý den byl bujón vyočkován na tři půdy (*Staphylococcus/Streptococcus* agar, Mannitol Salt agar a Chromogenní agar). Vzorky byly kultivovány dalších 24 hodin při 36 °C, a následně analyzovány. Z dvaceti okulárů bylo devatenáct kontaminovaných bakterií *Staphylococcus epidermidis*. U čtyř z těchto devatenácti vzorků byli navíc vykultivovány další zástupci rodu *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus*).

Před zavedením laminárního systému na sálech byla častost hloubkové infekce 3,4 % a primárně byla spojována s kožními komenzály, nejčastěji se *S. epidermidis* (Lidwell, 1988). Bakteriální zátěž může vzniknout i z jiných zdrojů, a to buď od pacientů, nebo z nesterilních závěsů, plášťů a rukavic. Odhalená oblast obličeje je také zdrojem infekce, i přes nošení ochranné chirurgické roušky (Butt et al., 2012).

Stejně jako ve střevě jsou prospěšné bakterie, tak i lidské oko je osídlováno bakteriemi, které zabraňují vzniku infekcí škodlivými bakteriemi. Patří mezi ně zejména zástupci grampozitivních rodů *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Corynebacterium*, a také

některé gramnegativní druhy náležející k rodům *Haemophilus* a *Neisserie*. To značí, že oko není sterilní a má svůj mikrobiom, jako i pokožka nebo trávicí trakt. Nošením kontaktních čoček dochází ke změnám normálního mikrobiomu oka. Za infekce očí je nejčastěji zodpovědný druh *Staphylococcus aureus*. Mimo to bylo dokázáno, že při nošení kontaktních čoček se až trojnásobně zvyšuje počet zástupců rodů *Methylobacterium*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter* a *Pseudomonas*. Dále se na kontaktních čočkách ve zmíněné studii vyskytovali zástupci *Bacillus* sp., *Rothia* sp. a *Streptococcus* sp. (Keener, 2015).

V experimentální části bylo zjištěno, že pravděpodobně izoláty náležející k rodu *Staphylococcus* způsobovaly obtíže při nošení kontaktních čoček, jako bylo pálení, řezání očí, červené oči, nadměrné slzení, výskyt sekrece, vysychání a jiné. Tudíž prezentované výsledky vykultivovaných mikroorganismů z kontaktních čoček v rámci této bakalářské práce, odpovídaly výše zmíněné studii Keener (2015).

Většina publikovaných studií se zabývá především mikrobiomy střeva (Shreiner et al., 2015; Alrafas et al., 2019), kde bakterie působí jako ochranný faktor proti kolonizaci patogenními bakteriemi. Bylo dokázáno, že také na povrchu oka se vyskytují bakterie, které působí proti invazi cizích bakterií, které mohou vést až k infekci (Bonini et al., 2005).

Oční mikrobiom byl doposud poměrně opomíjen. Nošení kontaktních čoček je spojeno se změnami v očním mikrobiomu. Byl zjištěn vyšší výskyt kmenů náležející k rodům *Merhylobacterium*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* a s nižším výskytem *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* a *Corynebacterium*. To nasvědčuje tomu, že jsou příčinou pro oční stavy jako je papilární konjunktivitida (reakce víčkové spojivky) a keratitida (onemocnění rohovky) (Shin et al., 2016).

Za základní studii v této oblasti je brána studie Dong et al., 2011, která se zabývala identifikací struktury mikrobiomu kontaktních čoček a spojivky jejich nositelů pomocí sekvencování 16S rDNA. Interindividuální variabilita jednotlivých mikrobů očního povrchu byla velmi významná. Až 31 % analyzované DNA patřilo k neklasifikovaným bakteriím. Bez ohledu na to bylo identifikováno 12 rodů – *Pseudomonas*, *Prorionibacterium*, *Bradyrhizobium*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Brevundimonas*, *Staphylococcus*, *Aquabacterium*, *Shingomonas*, *Streptococcus*, *Streptophyta* a *Methylobacterium*, které představovaly domnělé 'jádro' spojivkové mikrobioty. Zdravá spojivka nečekaně obsahovala mnoho rodů, které jsou běžně identifikovány jako oční povrchové patogeny.

Huang et al., 2016 studoval oční povrch u nenositelů kontaktních čoček. Odběr vzorků byl prováděn ve sterilní oftalmologické místnosti. Od 31 účastníků studie (16 mužů a 15 žen) byly pomocí jednorázových sterilních absorpčních vatových tamponů odebrány vzorky z očního povrchu. Z 31 vzorků bylo vykultivováno 25 rodů a 526 odlišných kmenů. Více než 76 % zastupovali příslušníci rodů *Corynebacterium*, *Pseudomonas*,

*Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Millisia*, *Anaerococcus*, *Finegoldia*, *Simonsiella* a *Veillonella*.

Výsledky studie Huang et al., 2016 byly porovnány s výsledky nositelů čoček vykultivovaných v rámci bakalářské práce, u nositelů kontaktních čoček byly vykultivovány pouze dva shodné kmeny, a to *Staphylococcus* a *Streptococcus* (tabulka 8). V bakalářské práci z kontaktních čoček byly vykultivovány 4 kmeny a 13 odlišných druhů. Větší zastoupení mikroorganismů bylo vykultivováno ze vzorků z brýlových čoček, 9 kmenů a 22 odlišných druhů.

Grzybowski et al., 2017 uvedl, že v očním mikrobiomu byly nejčastěji vykultivovány koaguláza negativní stafylokoci (CoNS, např. *S. epidermidis*), *Propionibacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus aureus* a *Micrococcus* sp. Počet získaných vykultivovaných mikroorganismů byl nižší ze vzorků slzného filmu, jelikož slzy fungují jako antimikrobiální obrana – obsahují antimikrobiální enzym lysozym a také působí spolu s mechanickým působením očních víček při mytí patogenů, a vyšší u stěrů ze spojivek a víček s patogenními organismy, jako je například *Pseudomonas* sp. (Capriotti et al., 2009; Ozkan et al., 2012; Grzybowski et al., 2017). Srovnání zjištěného mikrobiomu povrchu oka v rámci bakalářské práce s vybranými studiemi v této oblasti je uvedeno v tabulce 8.

Ve studii McDermott (2013) byla zjištěna poměrně vysoká stabilita očního mikrobiomu, jelikož je zdravé oko neustále zvlhčováno slzami, které poskytují stálé chemické prostředí a obsahují i antimikrobiálně působící látky (např. lysozym, betalysin, laktátdehydrogenáza, pyruvátkináza, amylázy a další). Dokonce právě na spojivce je vyšší bakteriální rozmanitost než na kůži. U nositelů kontaktních čoček byl pozorován výskyt *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Methylobacterium* a *Lactobacillus*, kdežto u těch, kteří kontaktní čočky nenosí, byly tyto mikroorganismy detekovány při vyšší relativní četnosti ve vzorcích kůže než ve spojivkách (s výjimkou *Lactobacillus* sp.), což naznačuje, že tyto bakterie by mohly být klasifikovány jako kožní bakterie (McDermott, 2013).

Tabulka 8: Porovnání výsledků studie Huang et al., 2016 a Dong et al., 2011 s výsledky bakalářské práce.

| <b>Zastoupení kmenů</b> |                                    |                           |                          |
|-------------------------|------------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>Bakalářská práce</b> | <b>Grzybowski et al.,<br/>2017</b> | <b>Huang et al., 2016</b> | <b>Dong et al., 2011</b> |
| <i>Bacillus</i>         | <i>Corynebacterium</i>             | <i>Corynebacterium</i>    | <i>Corynebacterium</i>   |
| <i>Rothia</i>           | <i>Propionibacterium</i>           | <i>Pseudomonas</i>        | <i>Pseudomonas</i>       |
| <i>Staphylococcus</i>   | <i>Staphylococcus</i>              | <i>Staphylococcus</i>     | <i>Staphylococcus</i>    |
| <i>Streptococcus</i>    | <i>Micrococcus</i>                 | <i>Acinetobacter</i>      | <i>Streptococcus</i>     |
| <i>Pseudomonas</i>      |                                    | <i>Streptococcus</i>      | <i>Acinetobacter,</i>    |
|                         |                                    | <i>Millisia</i>           | <i>Brevundimonas,</i>    |
|                         |                                    | <i>Anaerococcus</i>       | <i>Prorionibacterium</i> |
|                         |                                    | <i>Finegoldia</i>         | <i>Aquabacterium,</i>    |
|                         |                                    | <i>Simonsiella</i>        | <i>Shingomonas,</i>      |
|                         |                                    | <i>Veillonella</i>        | <i>Streptophyta</i>      |
|                         |                                    |                           | <i>Methylobacterium</i>  |
|                         |                                    |                           | <i>Bradyrhizobium</i>    |

## 8. Použitá literatura

- Alrafas H. R. D., Busbee B., Nagarkatti P., Nagarkatti M. (2018) Effect of 3,3'-diindolylmethane on gut microbiome in colorectal cancer. *J Immunol* **200**(1). Dostupné z: [http://www.jimmunol.org/content/200/1\\_Supplement/177.21/tab-article-info](http://www.jimmunol.org/content/200/1_Supplement/177.21/tab-article-info); Staženo 5. 4. 2019.
- Arciola C. R., Baldassarri L., Montanaro L. (2002) In catheter infections by *Staphylococcus epidermidis* the intercellular adhesion (*ica*) locus is a molecular marker of the virulent slime-producing strains. *J Biomed Mater Res* **59**(3), 557-62.
- Arciola C. R., Baldassarri L., Montanaro L. (2001) Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* **39**, 2151–2156.
- Backhed F., Fraser C. M., Ringel Y., Sanders M. E., Sartor R. B., Sherman P. M., Versalovic J., Young V., Finlay B. B. (2012) Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host Microbe* **12**, 611–622.
- Belizário J. E., Napolitano M. (2015) Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Front in Microbiol* **6**, 6:1050
- Belkaid Y., Hand T. W. (2014) Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* **157**(1), 121-141.
- Bonini S., Micera A., Iovieno A., Lambiase A. (2005) Expression of toll-like receptors in healthy and allergic conjunctiva. *Ophthalmology* **112**(9),1548-1549.
- Buchanan R. E. (1955) Taxonomy. *Ann Rev Microbiol.* **9**, 1–20.
- Busse H. J., Denner E. B., Lubitz W. (1996) Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J Biotechnol* **47**(1), 3-38.
- Buszewski B., Rogowska A., Pomastovski P., Zloch M., Railean-Plugaru V. (2017) Identification of microorganisms by modern analytical techniques. *J of AOAC International* **100**(6), 1607-1623.
- Butt U., Saleem U., Yousuf K., El-Bouni T., Chamler A., Eid A. S. (2012) Infection risk from surgeons' eyeglasses. *J of Orthopaedic Surgery* **20**(1), 75-77.
- Byrd A. L., Belkaid Y., Segre J. A. (2018) The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiol* **16**(3), 143-155.
- Capriotti J. A., Pelletier J. S., Shah M., Caivano D. M. & Ritterband D. C. (2009) Normal ocular flora in healthy eyes from a rural population in Sierra Leone. *Internat ophthalmol* **29**, 81–84.



- de Nicolas M. M., Vindel A., offez-Nieto J. A. (1995) Epidemiological typing of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci. *J Hospital Infect* **29**(1), 35-43.
- Dong Q., Brulc J. M., Iovieno A., Bates B., Garoutte A., Miller D., Revanna K. V., Gao X., Antonopoulos D. A., Slepak V. Z., Shestopalov V. I. (2011) Diversity of bacteria at healthy human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**(8): 5408–5413.
- Fitzpatrick F., Humphreys H., Smyth E., Kennedy C. A., O'Gara J. P. (2002) Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Hosp Infect* **52**(3), 212-218.
- Frebourg, N. B., Lefebvre, S., Baert, S., Lemeland, J. F. (2000) PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J Clin Microbiol* **38**(2), 877-880.
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R., Keane, C. T. (1989) New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* **42**(8), 872-874.
- Gilbert P., Das J., Foley I. (1997) Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* **11**,160–167.
- Gram C. (1884) Über die isolierte färbung der Schizomyceten in Schnitt-und Trockenpärpareten. *Fortschr Med* **2**, 185-189.
- Grice E. A., Kong H. H., Renaud G. (2008) A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res* **18**, 1043–1050.
- Grice E. A., Kong H. H., Conlan S., Deming C. B., Davis J., Young A. C., Bouffard G. G., Blakesley R. W., Murray P. R., Green E. D. (2009) Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* **324**, 1190–1192.
- Guani-Guerra E., Santos-Mendoza T., Lugo-Reyes S. O., Teran L. M. (2010) Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol* **135**, 1–11.
- Grzybowski A., Brona P., Kim S. J. (2017) Microbial flora and resistance in ophthalmology: a review. *Graefe's archive for clinical and experimental Ophthalmology* **255**(5), 851-862.
- Helimann C., Schweitzer O., Gerke C., Vanittanakom N., Mack D., Götz F. (1996) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* **20**,1083–1091.
- Huang Y., Yang B., Li W. (2016) Defining the normal core microbiome of conjunctival microbial communities. *Clinical Microbiol and Infecti* **22**(7), 643.e7-643.e12.
- Christensen G. D., Simpson W. A., Bisno A. L., Beachey E. H. (1982) Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity* **37**(1), 318-326.

- Keener A. B. (2015) Contact Lenses Can Change the Ocular Microbiome. *The scientist exploring life, inspiring innovation*. Dostupné z: <https://www.the-scientist.com/the-scientist/contact-lenses-can-change-the-ocular-microbiome-35368>; Staženo 1.2.2019.
- Kostrzewa M., Schubert S. (2017) MALDI-TOF Mass spectrometry in microbiology: Current trends. *Curr Issues Mol Biol* **23**, 17-20.
- Kvasničková E. (2016) Biofilmy: Život mikroorganismů v jednotném společenství. Dostupné z <https://www.vscht.cz/popularizace/doktorandi-pisou/biofilmy>; Staženo 18.3.2019.
- Ladizinski B., McLean R., Lee K. C., Elpern D. J., Eron L. (2014) The human skin microbiome. *Int J Dermatol* **53**, 1177–1179.
- Lazarevic V., Whiteson K., Huse S. (2009) Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *J Microbiol Methods* **79**, 266–271.
- Leger A. J. St., Desai J. V., Drummond R. A., Kugadas A., Almaghrabi F., Silver P., Raychaudhuri K., Gadjeva M., Iwakura Y., Lionakis M. S., Caspi R. R. (2017) An ocular commensal protects against corneal infection by driving an interleukin-17 response from mucosal  $\gamma\delta$  T cells. *Immunity* **47**(1), 148-158.
- Lidwell O. M. (1988) Air, antibiotics and sepsis in replacement joints. *J Hosp Infect* **11**, 18–40.
- McDermott A. M. (2013) Antimicrobial compounds in tears. *Exp Eye Res* **117**, 53–61.
- Moore E. R. B., Mihaylova S. A., Vandamme P., Krichevsky M. I., Dijkshoorn L. (2010) Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons. *Res Microbiol* **161**(6), 430-438.
- Mulder J. G., Degener J. E. (1998) Slime-producing properties of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *Clin Microbiol Infect* **4**(12), 689-694.
- Naik S., Bouladoux N., Wilhelm C., Molloy M. J., Salcedo R., Kastenmuller W., Deming C., Quinones M., Koo L., Conlan S., Spencer S., Hall J. A., Dzutsev A., Kong H., Campbell D. J., Trinchieri G., Segre J. A., Belkaid Y. (2012) Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science* **337**, 1115–1119.
- Nyč O., Bubeníček K. (2015) MALDI TOF – Špičková technologie pro mikrobiologii 21. století. *Královéhradecký laboratorní Bulletin*, **3**, 1-2.
- Ostaff M. J., Stange E. F., Wehkamp J. (2013) Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Mol Med* **5**, 1465–1483.
- Ozkan J., Zhu H., Gabriel M., Holden B. A., Willcox M. D. (2012) Effect of prophylactic antibiotic drops on ocular microbiota and physiology during silicone hydrogel lens wear. *Optometry & Vision Science* **89**, 326–335.
- Rasmussen T. T., Kirkeby L. P., Poulsen K., Reinholdt J., Kilian M. (2000) Resident aerobic microbiota of the adult human nasal cavity. *APMIS* **108**, 663–675.

- Rosenthal M., Goldberg D., Auello A., Larson E., Foxman B. (2011) Skin microbiota: Microbial community structure and its potential association with health and disease, *Infect, Genetics and Evol* **11**(5), 839-848.
- Růžička F., Holá V., Votava M., Tejkalová R., Horvath R., Heroldová M., Woznicová V. (2004) Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia Microbiol* **49**(5), 596-600.
- Shaikh-Lesko R. (2014) Visualizing the ocular microbiome. *The Scientist exploring life, inspiring innovation*. Dostupné z: <https://www.the-scientist.com/news-opinion/visualizing-the-ocular-microbiome-37503>; Staženo 3.3.2019.
- Shin H., Price K., Albert L., Dodick J., Park L., Dominguez-Bello M. G. (2016) Changes in the eye microbiota associated with contact lens wearing. *MBio* **7**(2), e00198-16
- Shreiner A. B., Kao J. Y., Young V. B. (2015) The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin in Gastroenterol* **31**(1), 69-75.
- Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B., Svabic-Vlahovic M. (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* **40**(2), 175-179.
- Szczotka-Flynn L. B., Imamura Y., Chandra J. (2009) Increased resistance of contact lens-related bacterial biofilms to antimicrobial activity of soft contact lens care solutions. *Cornea* **28**, 918–926.
- Szczotka-Flynn L. B., Pearlman E., Ghannoum M. (2010) Microbial contamination of contact lenses, lens care solutions, and their accessories: A literature review. *Eye & contact lens. Science & Clinical Practice* **36**(2), 116-129.
- Takeda N., Pomerantz S. C., McCloskey J. A. (1991) Detection of ribose-methylated nucleotides in enzymatic hydrolysates of RNA by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* **562**, 225–235.
- Tang Y-W., Ellis N. M., Hopkins M. K., Smith D. H., Dodge D. E., Persing D. H. (1998) Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* **36**(12), 3674–3679.
- Ueta M., Kinoshita S. (2012) Ocular surface inflammation is regulated by innate immunity. *Progress in Retinal and Eye Research* **31**(6), 551-575.
- Votava M. (2005) Lékařská mikrobiologie obecná. Nakladatelství Neptun.
- Zhou Y., Mihindukulasuriya K. A., Gao H., La Rosa P. S., Wylie K. M., Martin J. C., Kota K., Shannon W. D., Mitreva M., Sodergren E., Weinstock G. M. (2014) Exploration of bacterial community classes in major human habitats. *Genome Biol* **15**(5).
- Ziebuhr W., Heilmann C., Götz F., Meyer P., Wilms K., Straube E., Hacker J. (1997) Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun* **65**, 890–896.

## Přílohy

Příloha 1: Dotazník, který byl rozdáán a vyplněn 50 respondenty

### DOTAZNÍK

*Tento dotazník poslouží jako podklad pro bakalářskou práci na téma 'Mikrobiální kontaminace brýlových a kontaktních čoček'. Vyplnění tohoto dotazníku je anonymní a dobrovolné. Dotazník obsahuje dva typy otázek. Děkuji za pravdivé vyplnění.*

Žena       Muž      Věk .....

Nositel :     kontaktních čoček       brýlí       kontaktních čoček i brýlí

**Užívám kontaktní čočky:**.....

Užívám kontaktní čočky s režimem nošení:  denní  týdenní  čtrnáctidenní  měsíční

čtvrtletní  roční  kontinuální (30dní a 29nocí)

Tento pár kontaktních čoček již užívám: ..... dní / měsíců

Tento pár kontaktních čoček přenáším: ..... dní / měsíců

Kolik hodin denně nosíte kontaktní čočky?.....

Myjete si ruce vždy před manipulací s čočkami?  ANO       NE

Způsob čištění kontaktních čoček:  oplach roztokem     chemické čištění (peroxidové roztoky)

manuální čištění     žádný

Užívám tento roztok pro uchování kontaktních čoček:.....

Roztok měním:  při každé manipulaci s čočkami     1x denně

jednou za 2 dny       v delších intervalech

Čistíte pouzdro na kontaktní čočky denně?  ANO       NE

Jak často měníte pouzdro na kontaktní čočky?

1x za měsíc     1x za 2 měsíce     méně často     s každým novým roztokem

Zaznamenal/a jsem potíže při nošení kontaktních čoček/brýlí:  ANO       NE

Případné obtíže:  pálení     řezání     červené oči     nadměrné slzení     výskyt sekrece