



**MASARYKOVA UNIVERZITA**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
**ÚSTAV BIOCHEMIE**

---



# **DNA DIAGNOSTIKA INFEKČÍ**

## **DÝCHACÍCH CEST**

Diplomová práce

**Bc. Tereza Pavlíková**

Vedoucí práce: prof. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.

Brno 2018

## Bibliografický záznam

**Autor:** Bc. Tereza Pavlíková  
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita  
Ústav biochemie

**Název práce:** DNA diagnostika infekcí dýchacích cest

**Studijní program:** Biochemie

**Studijní obor:** Bioanalytik – odborný pracovník v laboratorních metodách

**Vedoucí práce:** prof. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.

**Akademický rok:** 2017/2018

**Počet stran:** 84

**Klíčová slova:** Respirační infekce, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomonas pneumoniae*, PCR

## Bibliographic Entry

**Author** Bc. Tereza Pavlíková  
Faculty of Science, Masaryk University  
Department of Biochemistry

**Title of Thesis:** DNA diagnostics of respiratory infections

**Degree programme:** Biochemistry

**Field of Study:** Bioanalyst – Specialist in Laboratory methods

**Supervisor:** prof. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.

**Academic Year:** 2017/2018

**Number of Pages:** 84

**Keywords:** Respiratory infections, *Legionella pneumophila*,  
*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomonas pneumoniae*,  
PCR

## Abstrakt

Diplomová práce se zaměřuje na sběr a analýzy vzorků od pacientů praktických lékařů a dobrovolníků s infekcemi dýchacích cest. Infekce respiračního traktu patří mezi nejčastější diagnózy stanovené praktickými lékaři v zimních měsících. Mezi běžné diagnostické metody patří kultivace, průkaz antigenu, protilátek a nukleových kyselin. Jsou však bakterie jako *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* a *Chlamydomphila pneumoniae*, kde je kultivace poměrně náročná a tak se stále častěji v diagnostice uplatňuje detekce bakteriální DNA pomocí metody PCR. V rámci praktické části práce bylo vyšetřeno celkem 92 vzorků na přítomnost DNA *L. pneumophila*, *M. pneumoniae* a *C. pneumoniae* a 8 vzorků bylo prohlédnuto pod transmisním elektronovým mikroskopem, zda se ve vzorku nenacházejí virové částice. Před odběrem vzorku byl s pacientem vyplněn dotazník, kde byly uvedeny příznaky a případná léčba a následně byly výsledky statisticky zpracovány.

## Abstract

The diploma thesis focuses on the collection and analyses of samples from patients of general practitioners and volunteers with respiratory infections. Respiratory tract infections are among the most common diagnoses prescribed by general practitioners in the winter months. Common diagnostic methods include cultivation, detection of antigen, antibodies and nucleic acids. However, there are bacteria such as *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydomphila pneumoniae*, where the cultivation is quite demanding and therefore the detection of bacterial DNA using the PCR method is increasingly used in diagnostics. In the practical part of the work a total of 92 samples were examined for the presence of *L. pneumophila*, *M. pneumoniae* and *C. pneumoniae*, and 8 specimens were examined under a transmission electron microscope for the presence of virus particles in the sample. Before sampling, was completed a questionnaire with the patient symptoms and treatment, and then the results were statistically processed.



MASARYKOVA UNIVERZITA  
Přírodovědecká fakulta

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2016/2017

**Ústav:** Ústav biochemie  
**Studentka:** Bc. Tereza Pavlíková  
**Program:** Biochemie  
**Obor:** Bioanalytik - odborný pracovník v laboratorních metodách

Ředitel Ústavu biochemie PFF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

**Název práce:** DNA diagnostika infekcí dýchacích cest  
**Název práce anglicky:** DNA diagnostics of respiratory infections

### Oficiální zadání:

V průběhu zimních měsíců bude student průběžně získávat klinické vzorky z dýchacích cest na pracovištích praktických lékařů a specialistů ORL z Brna a okolí. Z těchto vzorků bude izolovat nukleové kyseliny a pomocí metod RealTime PCR bude detekovat přítomnost bakterií: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, viru chřipky typu A, B a pandemické chřipky, eventuálně dalších patogenů. Od lékařů budou získána data o antibiotické léčbě a průběhu léčby ke každému vzorku. Cílem práce je získání přehledu o rozšíření uvedených infekcí dýchacích cest v zimním období, zjištění vhodnosti a účinnosti antibiotické terapie a zjištění případné výhodnosti používání DNA diagnostiky uvedených onemocnění v klinické praxi vzhledem k ekonomice léčby.

**Jazyk závěrečné práce:** čeština

**Vedoucí práce:** doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.

**Datum zadání práce:** 24. 10. 2016

**V Brně dne:** 27. 11. 2016

Souhlasím se zadáním (podpis, datum):

Bc. Tereza Pavlíková  
studentka

doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.  
vedoucí práce

doc. RNDr. Oldřich Janiczek, CSc.  
zástupce ředitele Ústavu biochemie  
pro pedagogické záležitosti

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu práce panu profesorovi RNDr. Omarovi Šerému, Ph.D. za odborný dohled, rady při vypracování práce a pomoc při oslovování praktických lékařů. Stejně tak bych chtěla poděkovat Mgr. Růženě Manišové za její pomoc se získáváním vzorků a pomoc při laboratorní práci. Mé poděkování patří i MVDr. Pavlu Kulichovi, Ph.D. za pomoc při zpracování vzorků pro elektronovou mikroskopii. A na závěr děkuji společnosti ELISABETH PHARMACON, spol. s. r. o. za financování praktické části mé práce.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 11. května 2018

.....

Tereza Pavlíková

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Teoretický úvod</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Infekce dýchacích cest</b> .....	<b>11</b>
2.1.1	Infekce horních cest dýchacích.....	11
2.1.1.1	Infekce nosu a nosohltanu.....	11
2.1.1.2	Infekce hltanu a mandlí.....	12
2.1.1.3	Infekce vedlejších nosních dutin a ucha.....	12
2.1.1.4	Infekce hrtanu a průdušnice.....	13
2.1.2	Infekce dolních cest dýchacích.....	14
2.1.2.1	Infekce průdušek.....	14
2.1.2.2	Infekce plic.....	14
<b>2.2</b>	<b>Původci infekcí dýchací soustavy</b> .....	<b>16</b>
2.2.1	Bakteriální infekce.....	16
2.2.1.1	<i>Legionella pneumophila</i> .....	16
2.2.1.2	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	18
2.2.1.3	<i>Chlamydophila pneumoniae</i> .....	19
2.2.2	Virové infekce.....	21
2.2.2.1	Influenza virus.....	21
2.2.2.2	RS-virus.....	23
2.2.2.3	Metapneumovirus.....	24
2.2.2.4	Adenovirus.....	24
2.2.2.5	Parainfluenza virus.....	25
2.2.2.6	Rhinovirus a koronavirus.....	26
<b>2.3</b>	<b>Diagnostika respiračních infekcí</b> .....	<b>26</b>
2.3.1	Mikroskopie.....	27
2.3.1.1	Transmisní elektronová mikroskopie.....	27

2.3.2	Kultivace.....	28
2.3.3	Biochemické testy.....	29
2.3.4	Detekce antigenu.....	29
2.3.5	Detekce protilátek .....	30
2.3.6	PCR.....	30
<b>3</b>	<b>Cíle práce.....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>Metodika.....</b>	<b>33</b>
4.1	Vzorky .....	33
4.2	Izolace DNA.....	33
4.3	Real-Time PCR detekce <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> a <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> .....	34
4.4	Elektronová mikroskopie.....	38
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>40</b>
5.1	Real-Time PCR detekce <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> a <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> .....	40
5.2	Elektronová mikroskopie.....	42
5.3	Zpracování dotazníků.....	48
5.3.1	Pozitivní vzorky na <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	58
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>59</b>
6.1	Etiologie komunitních pneumonií .....	59
6.2	Léčba infekcí způsobených <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> a <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> .....	60
6.3	Srovnání cen vyšetření a citlivosti metod vzhledem k ekonomice léčby ..	61
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>Citovaná literatura .....</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>76</b>

## **Použité symboly a zkratky**

BAL	Bronchoalveolární laváž
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
KFR	Komplementfixační reakce
PCR	Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
TEM	Transmisní elektronový mikroskop

## 1 Úvod

S nástupem chladných a sychravých dní přibývá v ordinacích praktických lékařů pacientů, které trápí infekce dýchacích cest. Tyto infekce bývají doprovázeny příznaky jako je rýma, kašel, bolest v krku, zvýšená teplota apod. Příznaky a příčiny respiračních infekcí jsou závislé na umístění v dýchací soustavě. Podle lokalizace je můžeme zjednodušeně rozdělit na onemocnění horních cest dýchacích, jejichž součástí jsou i infekce vedlejších nosních dutin a také infekce středouší, a infekce dolních cest dýchacích. Výskyt těchto onemocnění bývá nejčastější u lidí s oslabenou imunitou a v kolektivech, převážně v těch dětských. Nejčastějším původci zánětů dýchacích cest jsou viry, kam patří například viry chřipky a parainfluenzy, adenoviry, RS-viry, rinoviry a další. Menší část zánětů dýchacích cest je způsobena bakteriemi, ačkoliv nežádá jsou tyto infekce komplikací předchozí virové infekce.

U virových infekcí není bližší diagnostika původce potřebná, pokud u pacienta nenastanou komplikace a jejich léčba je obvykle spíše podpůrná, spočívající ve zmírnění klinických příznaků. U bakteriálních infekcí je vhodné zjistit původce, aby byla zvolena cílená léčba antibiotiky. Nejpoužívanější metodou k určení bakteriálního původce je kultivace klinického materiálu, případně pak jeho dourčení pomocí biochemických testů, MALDI-TOF atd. U bakterií, které jsou těžko kultivovatelné, se v dnešní době čím dál častěji využívá metod, které jsou schopné zjistit bakteriální DNA nacházející se v klinickém materiálu.

## 2 TEORETICKÝ ÚVOD

### 2.1 INFEKCE DÝCHACÍCH CEST

Respirační infekce patří mezi nejčastější onemocnění, kvůli kterým lidé navštěvují své lékaře. Z velké části jsou onemocnění dýchacího traktu způsobená viry, bakteriální infekce nejsou tak časté, sekundárně se všech můžou vyskytovat jako komplikace virových infekcí. Příznaky, patogeneze, diagnostika a případná léčba se můžou v rámci lokalizace infekce lišit [1].

Alespoň částečnou pomocí může být pro lékaře rychlý test CRP z krve, při nízkých koncentracích zhruba do 40 mg/l se s největší pravděpodobností jedná virovou infekci a není tedy potřeba zvolit antibiotickou léčbu [2].

#### 2.1.1 INFEKCE HORNÍCH CEST DÝCHACÍCH

##### 2.1.1.1 INFEKCE NOSU A NOSOHLTANU

Záněty nosu a nosohltanu jsou obvykle součástí běžného nachlazení (common cold). Jsou způsobeny v polovině případů rhinoviry, dále koronaviry, adenoviry a dalšími respiračními viry, ovšem nikoliv viry chřipek, pro něž nebývá rýma typickým příznakem. U rhinovirů bylo již popsáno více než 100 sérotypů, avšak neexistuje mezi nimi zkřížená imunitní reakce, proto býváme nachlazení opakovaně. Nepříjemnou komplikací rhinitidy a nasopharyngitidy je druhotná bakteriální infekce, jejímž projevem je změna bezbarvého hlenovitého nosního sekretu na hnisavý žlutozelené barvy. Původcem sekundárních bakteriálních infekcí bývá nejčastěji *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae*. U chronické rhinitidy můžeme často z klinického materiálu určit jako původce bakterii *Klebsiella rhinoscleromatic* nebo *Klebsiella ozaena*.

Diagnostika virového původce je zde obvykle zbytečná a v praxi se neprovádí. Ke zjištění sekundárního bakteriálního původce se provádí výtěr z nosu, pakliže je rýma komplikovaná, výtěry z nosohltanu se provádí spíše ke sledování nosičství *Neisseria meningitidis* a záchyt *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis*, původce dávivého kašle [2, 3].

#### **2.1.1.2 INFEKCE HLTANU A MANDLÍ**

Laryngitidy a tonzilitidy bývají kromě rhinovirů a koronavirů způsobeny adenoviry. U bakteriálních infekcí se v klinickém materiálu pátrá po *Streptococcus pyogenes*, beta-hemolytickém streptokokovi skupiny A, který může způsobovat pozdní následky.

Příznakem angín a infekcí hltanu může být zvětšení lymfatických uzlin (*adenovirus*, *EB-virus*), drobné skvrny způsobené rozšířením cévek na sliznici patra a hltanu (rhinoviry), tvorba povlaků až pablán (difterie, EB-viry), bělavé povlaky (*Candida albicans*) a také horečka, bolesti svalů a únava (chřipkové viry).

Diagnostika infekcí způsobených viry není opět potřebná. Z výtěru krku, stěru mandlí a stěny hltanu se pátrá především po zmíněném beta-hemolytickém streptokokovi skupiny A (*Streptococcus pyogenes*), případně streptokokovi jiné skupiny, pneumokokovi, meningokovi, hemofilovi nebo původci záškrtu (*Corynebacterium diphtheriae*) [2, 3].

#### **2.1.1.3 INFEKCE VEDLEJŠÍCH NOSNÍCH DUTIN A UCHA**

Záněty zevního ucha bývají způsobené především bakteriemi *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. U infekcí středního ucha a vedlejších nosních dutin se opět uplatňují především respirační viry, z bakterií se primárně uplatňuje *Mycoplasma pneumoniae*. Sekundární hnisavé infekce středouší jsou způsobené hlavně bakteriemi *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*,

*Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* a anaerobní bakterie (*Bacteroides* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Prevotella* spp. a další).

K určení původce se odebírá sekret ze středního ucha, popřípadě výtěr ze zvukovodu u zánětů vnějšího ucha. Výplach z dutiny lze použít k určení bakterií způsobující sinusitidy [2, 3].

#### **2.1.1.4 INFEKCE HRTANU A PRŮDUŠNICE**

Život zvláště malého dítěte může být ohrožen infekcí hrtanové příklopky, kterou způsobuje *Haemophilus influenzae* typu B. Při podezření na epiglotitidu se však neprovádí stěr z důvodu možného laryngospasmu, místo toho je však možné odebrat krev na hemokulturu. Díky očkování proti *Haemophilus influenzae* typu B se epiglotitida u dětí již téměř nevyskytuje.

Nejčastějšími původci zánětů hrtanu a průdušnice jsou viry parainfluenzy, chřipky a RS-viry. U laryngitid a tracheitid se však nevyskytují infekce způsobené rhinoviry, neboť jim svědčí teplota spíše nižší než 37 °C a vyhovuje jim teplota nosní sliznice, která je v rozmezí 33 až 35 °C. Primární infekce, které způsobují bakterie, jsou zapříčiněny především *Chlamydomphila pneumoniae* a také *Corynebacterium diphtheriae*, jenž je původcem záškrtu a může způsobit pseudomembranózní laryngotracheitidu. V sekundárních infekcích, které navazují na primární virovou infekci, se nejvíce uplatňují *Staphylococcus aureus* a hemofily.

Z důvodu závažnosti zánětů hrtanu a průdušnice je více než vhodné provést virologické vyšetření, při kterém je pomocí imunologických metod prokazován virový antigen, v současné době se vzhledem k rychlosti a citlivosti stále více uplatňuje PCR. Při podezření na záškrť se provádějí stěry z pablán, které se kultivují na speciálních půdách [2, 3].

## 2.1.2 INFEKCE DOLNÍCH CEST DÝCHACÍCH

### 2.1.2.1 INFEKCE PRŮDUŠEK

Stejně jako u infekcí horních cest dýchacích se u bronchitid uplatňují z větší části jako původci viry, zvláště je tomu tak u dětí. Uplatňují se zde především viry chřipky, viry parainfluenzy, adenoviry a RS-viry. RS-viry mimo jiné způsobují i infekce průdušinek u kojenců. Primárními infekčními činiteli se můžou stát bakterie *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Bordetella pertusis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia*, z nichž dvě poslední jmenované bakterie se často vyskytují u osob s cystickou fibrózou. Zlaté stafylokoky, hemofily a pneumokoky mohou způsobovat sekundární infekce bronchů [2, 3].

### 2.1.2.2 INFEKCE PLIC

Příčiny zánětů plic jsou opravdu rozmanité. Liší se u pneumonií, které jsou akutní, subakutní a chronické, u dětí a dospělých, dokonce i u lidí, kteří byli původně zdraví, kteří jsou imunokompromitovaní, popřípadě u lidí, kteří jsou v kontaktu se zvířaty.

Akutní pneumonie u dospělých lidí způsobují především *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* a *Haemophilus influenzae*. U dětí pneumonie vyvolávají hlavně *Haemophilus influenzae*, pneumokoky a enterobakterie *Klebsiella pneumoniae*, u kojenců jsou to *Streptococcus agalactiae* a *Chlamydia trachomatis*. Záněty průdušek a plic u starších lidí a seniorů mají na svědomí především viry chřipky a na ně následně nasedají sekundární bakteriální infekce. Život ohrožující sekundární abscedující pneumonie jsou způsobeny vysoce virulentní kmeny *Staphylococcus aureus*, které produkují Pantonův-Valentinův leukocidin (exotoxin, který poškozují membránu leukocidů) a mohou tak usmrtit i předtím zdravého jedince.

Subakutní a chronické záněty plic probíhají většinou jako tuberkulóza, kterou vyvolává *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium bovis*. Plicní abscesy vznikají následkem aspiračních pneumonií zapříčiněných především anaerobními bakteriemi a někdy zlatým stafylokokem.

Vhodným materiálem k laboratornímu průkazu jsou především hemokultury a bronchoalveolární laváž. Sputum je méně vhodný vzorek, přestože pochází z dolních cest dýchacích, je vždy kontaminován bakteriemi z horních částí dýchacích cest a také z úst [2–4].

## 2.2 PŮVODCI INFEKČÍ DÝCHACÍ SOUSTAVY

### 2.2.1 BAKTERIÁLNÍ INFEKCE

*Legionella pneumophila*, *Chlamydophila pneumoniae* a *Mycoplasma pneumoniae* patří mezi původce, kteří dokáží u lidí způsobit primární bakteriálních infekcí dýchacích cest a mohou způsobit těžké pneumonie. Od ostatních bakteriálních původců respiračních infekcí se liší především v tom, že jsou intracelulárními parazity a jsou hůře kultivovatelné než ostatní bakterie.

#### 2.2.1.1 LEGIONELLA PNEUMOPHILA

Do rodu *Legionella* patří desítky druhů, ale mezi nejvýznamnější patří *Legionella pneumophila*, především její sérotypy 1 a 6, které jsou původci většiny infekcí způsobenými legionelou. Mezi další často izolované legionely patří například *Legionella bozemanii* a *Legionella micdadei*.

Legionely se běžně vyskytují v půdě a ve vodách, ať už v přírodních nebo ve vodovodních, kde dokáží odolávat vysokým teplotám i dezinfekčním prostředkům s obsahem chlóru. Stejně tak bývají legionely přítomné i v chladící kapalině v klimatizacích, odkud se snadno šíří do ovzduší a po inhalaci aerosolu vyvolávají infekci [5–8].

Bakterie rodu *Legionella* jsou gramnegativní krátké štíhlé tyčky, někdy až kokobacily, které mohou mít někdy i tvar tenkých vláken, především v kulturách. Byť jsou gramnegativní, tak Gramovo barvení vážou špatně, jelikož ve své bakteriální stěně obsahují charakteristické mastné kyseliny, které jiné bakterie ve svých buněčných stěnách nemají [9]. Legionely patří mezi intracelulární parazity, kteří se mohou množit v makrofázích a monocytech v alveolech. Ve vakuolách hostitelských buněk rostou a svými enzymy (fosfatáza, lipáza, nukleáza a proteázy) následně buňku zničí. V plicích nemocného dochází k vytvoření četných ložisek bronchopneumonie a následně k poškození celého plicního laloku a fibrotizaci tkáně [5, 10, 11].

Symptomatické infekce způsobené bakterií *Legionella pneumophila* mohou probíhat dvěma způsoby, a to jako pontiacká horečka nebo jako legionářská nemoc. Pro pontiackou horečku jsou typické vysoké teploty, bolesti svalů, nevolnost a zimnice. Infekce trvá jen krátce a poté dochází k samovolnému uzdravení, nedochází k poškození plic. Legionářská nemoc je těžkou formou infekce, postihuje především osoby se sníženou imunitou, kuřáky, starší osoby; může končit úmrtím pacienta. Inkubační doba je mezi 2 a 10 dny [8, 9, 12–14]. Typickými příznaky jsou vysoké teploty, třesavka, bolesti hlavy a na prsou, suchý a neproduktivní kašel. Kromě poškození plic, kde dochází ke vzniku mikroabscesů, jsou poškozeny i játra, ledviny, centrální nervová a gastrointestinální soustava. Největší riziko úmrtí na legionářskou nemoc hrozí imunokompromitovaným pacientům, jako jsou onkologičtí pacienti, osoby s AIDS a pacienti po transplantacích.

U pontiacké horečky terapie není nutná, příznaky odezní samy. U legionářské nemoci lze u lehčích případů nasadit tetracyklin, jinak se k terapii používá azithromycin a levofloxacin [5, 13].

Bakterie rodu *Legionella* lze stejně jako jiné bakterie prokázat dvěma způsoby, a to buď přímými metodami, kam patří například barvení, mikroskopie, kultivace, průkaz antigenu, PCR a další, a také nepřímými metodami, které prokazují přítomnost protilátek ve vzorku. K vyšetření *Legionella pneumophila* se odebírá sputum, aspirát z bronchů, plicní biopsie, pleurální výpotek, moč v případě průkazu antigenu a ke stanovení protilátek sérum. Legionely lze obarvit pomocí Gramova barvení, ale je potřeba prodloužit působení safraninu kvůli složení jejich buněčné stěny. Dále lze legionely znázornit pomocí stříbření, kde se poté jeví jako krátké kokobacily; a samozřejmě lze použít i přímou imunofluorescenci [5, 6, 15].

Legionely jsou aerobní bakterie, rostoucí při teplotách mezi 25 °C a 43 °C (některé kmeny rostou lépe při 35 – 36 °C a v atmosféře 2,5 – 5 %), jsou ale kultivačně náročné, protože nerostou na běžných kultivačních půdách, jako je například krevní agar. Ke svému růstu vyžadují půdy obsahující aminokyselinu cystein a železo. Speciální půdou pro kultivaci legionel je takzvaný BCYE agar, který kromě zmíněného cysteinu a železa obsahuje extrakt z kvasnic, který slouží jako zdroj živin, a černé uhlí, které odstraňuje toxické metabolity vznikající při růstu bakterií. Kolonie rostoucí na BCYE půdě se nejdříve objevují po 48 hodinách (obvykle však za 5 – 10 dní), mají šedou barvu

a ostré ohraničení [9, 15]. Některé druhy legionel dokáží v UV-světle fosforeskovat, to lze využít k jejich identifikaci. Biochemické testy se většinou nevyužívají, ale lze legionely identifikovat na základě jejich pohybu, pozitivní katalázy a hydrolýzy urey. Nedokáží fermentovat cukry, ale zkapalňují želatinu. Legionelový antigen lze zachytit v moči pomocí metody ELISA nebo pomocí komerčních testů, které ale diagnostikují pouze sérotyp 1 *Legionella pneumophila*.

Nepřímý průkaz je možný pomocí nepřímé imunofluorescence nebo metodou ELISA, ale je nutné počítat se zpožděním protilátkové odpovědi (8. – 10. den onemocnění), pro diagnostiku je nutný čtyřnásobný vzestup titru v rozmezí dvou až tří týdnů [5, 6, 16, 17].

#### **2.2.1.2 MYCOPLASMA PNEUMONIAE**

Mykoplazmata jsou malé bakterie, které nemají žádnou buněčnou stěnu, proto se prakticky Gramem nebarví, popřípadě jen velmi slabě a jeví se jako gramnegativní. Jsou velice pleomorfní, kromě kokovitého tvaru mohou vypadat jako kokobacily, prstence, činky i jako krátká nebo dlouhá vlákna. Pro *Mycoplasma pneumoniae* je typické, že na koncích může mít zvláštní struktury, díky nimž se dokáže přichytit na sliznici dýchacího traktu. V přírodě jsou velmi rozšířené a jsou mimo jiné významná tím, že často způsobují kontaminaci buněčných kultur [9, 18–20].

Infekce způsobené *Mycoplasma pneumoniae* mohou být mírné, leckdy asymptomatické. Obvykle se projevují především jako tracheobronchitidy, které mohou přejít v atypickou pneumonii. Infekce napadá tkáň mezi plicními sklípkami (intersticiem), nikoliv plicní sklípky, jak tomu bývá u jiných infekcí, například u pneumonie způsobené pneumokoky. Infekce bývají častější u dětí než dospělých, časté a běžné jsou v kolektivech mladých lidí, jejich průběh a následek záleží na věku, čím je pacient starší, tím může být průběh infekce horší. Inkubační doba je 7 – 28 dní [4, 21, 22]. Prvními příznaky onemocnění bývá bolest v krku, hlavy a svalů, teprve kolem třetího dne se objevuje suchý a dráždivý kašel [9, 18, 23]. K léčbě mykoplazmových infekcí se používá doxycyklin, makrolidy (především u dětských pacientů) případně chinolony [18, 24, 25].

Bakterie *Mycoplasma pneumoniae* je možné kultivovat pouze na speciálních půdách, především sérovém bujónu obohaceném o glukózu, kvasniční extrakt, antibiotikum penicilin G a fenolovou červeň, která slouží jako indikátor štěpení glukózy a v případě positivity mění barvu z červené na žlutou. Kolonie, které vyrostou na speciální obohacené půdě za 2 až 5 týdnů, jsou zrnité s úzkým průhledným lemem. Z důvodu pracnosti a dlouhé kultivační doby není kultivace běžnou diagnostickou metodou [6, 23, 26].

K nepřímému průkazu mykoplazmat se používají serologické reakce, především ELISA a komplementfixační reakce. Pro diagnostiku je vhodné vyšetřit dva vzorky, které mají mezi sebou časový odstup, hodnotí se titer séra, který je v případě pozitivního výsledku čtyřnásobný [5, 6, 18].

### **2.2.1.3 CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE**

Čeľad' *Chlamydiaceae* se dělí na dva rody, a to rod *Chlamydophila*, kam se řadí druhy *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci* a *Chlamydophila pecorum*, a rod, kam patří *Chlamydia trachomatis*.

Chlamydie jsou malé nepohyblivé bakterie, které jsou jen slabě barvitelné Gramem a jeví se jako gramnegativní. Chlamydie jsou označovány jako energičtí parazité, protože z hostitelské buňky získávají makroergní fosfáty. Tyto bakterie mají podobné složení buněčné stěny jako gramnegativní bakterie, ale na rozdíl od nich jim chybí peptidoglykan a naopak obsahují větší množství lipidů.

Bakterie *Chlamydophila pneumoniae* prodělávají v hostitelské buňce unikátní růstový cyklus, při kterém chlamydie mění svou morfologii. Růstový cyklus začíná infekční částicí, tzv. elementárním tělískem, které proniká do buňky podobně jako při endocytóze. Po několika hodinách se elementární tělísko přemění v retikulární tělísko, které už je metabolicky aktivní a binárním dělením se během 24 hodin mění zpět na elementární tělísko díky tomu, že spotřebuje veškerou energii napadené buňky. Po dokončení růstového cyklu chlamydie jsou hostitelské buňky natolik naplněny elementárními tělísky, že buňka praskne a elementární tělíska se vylijí do okolí, kde opět napadají vnímavé buňky. Celková délka buněčného cyklu se tak pohybuje mezi 48 – 72

hodinami. Retikulární tělíska ve fagosomech se jeví jako nitrobuněčné inkluze, které lze pomocí histologického barvení detekovat [5, 6, 27].

U sliznic, které mají na svém povrchu receptory pro elementární tělíska, tedy především sliznic dýchacích cest, spojivek a urogenitálního traktu, dochází po napadení chlamydiemi k rozpadu buněk. Následkem toho dochází k rozvoji zánětu, který se dál prohlubuje, a dojde k zjizvení tkáně, následkem toho může u očních infekcí dojít až ke ztrátě zraku anebo u infekcí genitálů k neplodnosti. *Chlamydomphila pneumoniae* napadá respirační trakt a způsobuje bronchitidy, pneumonie i sinusitidy [5]. Inkubační doba je poměrně dlouhá, je to okolo 3 až 4 týdnů. Infekce se šíří kapénkami nebo přímým kontaktem. Tyto infekce jsou časté především v kolektivech mladých lidí. S infekcí se setká většina populace už v dětském věku, která se však většinou projeví bez jakýkoliv symptomů. Při projevech infekce může nemocného bolet v krku, častý je i přetrvávající kašel, bolest hlavy a horečka [28, 29]. K terapii se používají tetracykliny, makrolidy a fluorochinolony. Délka léčby by měla být alespoň 2 – 3 týdny, aby zasáhla všechny fáze růstového cyklu chlamydií [5].

Kultivace chlamydií je velice náročná. Nelze je kultivovat na umělých půdách, ale pouze na tkáňových kulturách, kuřecích embryích, opičích buňkách nebo myších. [9] Proto se kultivace v praxi už nevyužívá. Ke kultivaci na tkáňové kultuře je potřeba odebrat od pacienta sputum. Ke kultuře se přidává cyklohexidin, který zabrání metabolismu hostitelských buněk. Dojde k adherenci chlamydií na povrch buněk pomocí centrifugace a vzniklé inkluze se pak mohou prokázat imunofluorescenčním barvením anebo barvením pomocí Lugolova roztoku. Metodou ELISA nebo přímou imunofluorescencí můžeme detekovat antigen, a to vnější membránové proteiny, které jsou specifitější anebo lipopolysacharidy. Pomocí molekulárně biologických metod jako jsou polymerázová řetězová reakce (PCR), ligasová řetězová reakce (LCR) a hybridizace DNA můžeme detekovat specifické úseky DNA. Vysoká citlivost a rychlost těchto metod je staví do popředí diagnostiky chlamydiových infekcí.

Protilátky proti *Chlamydomphila pneumoniae* můžeme prokázat pomocí sérologických metod. Nevýhodou ale je, že u primární infekce nemusí dojít k vzestupu titru protilátek a stejně tak mohou protilátky dlouhodobě přetrvávat. Tvorba protilátek se objevuje až za 6 – 8 týdnů po nakažení. Mimo jiné se k detekci *Chlamydomphila pneumoniae* dá použít i mikroimunofluorescenční metoda [5, 6, 30, 31].

## 2.2.2 VIROVÉ INFEKCE

Virové infekce způsobují většinu zánětů dolních cest dýchacích. Některé viry způsobují pouhé nachlazení a infekce mají lehký průběh, některé mohou naopak způsobit těžké pneumonie.

### 2.2.2.1 INFLUENZA VIRUS

Viry chřipky mají tři zástupce, respektive Influenza virus A, Influenza virus B a Influenza virus C. Nejdůležitější je virus chřipky A, jako jediný dokáže vyvolat pandemii. Viriony chřipky A mají velikost okolo 80-120 nm, jsou oválné nebo mají pleiomorfní tvar, někdy nabývají podoby dlouhých vláken [32, 33]. Segmentované vlákno RNA je uložené ve spirálovité nukleokapsidě, která je s enzymem RNA polymerasou schovaná v obalu. Virový obal nese dva typy výběžků, a to hemagglutinin, díky němuž se virová částice přichytí na povrchové receptory vnímavé buňky a je schopný shlukovat červené krvinky, a druhý typ výběžku neuraminidasu, díky němuž se virus dokáže uvolnit z buňky [5, 34]. Influenzavirus A se rozděluje na podtypy, jako je např. H1N1, podle různé antigenní stavby hemagglutininu (18 antigenů) a neuraminidasy (11 antigenů) [35]. Každou sezónu dochází ke změnám antigenů na výběžcích (antigenní drift). Během let se objeví nový podtyp chřipky (antigenní shift), který vzniká v hostitelské buňce, ve které se pomnoží dva odlišné viry chřipky a vymění si mezi sebou některé části svého genomu. Výsledkem pak může být rozvoj globální pandemie chřipky. Díky antigenním změnám je imunita vůči chřipce pouze dočasná, proto se očkovací látka připravuje každou sezónu s jiným antigenním složením, podle nejnovějších kolujících kmenů. Přestože mají influenza viry obal a jsou citlivé vůči dezinfekčním prostředkům, jejich uchování v laboratoři je poměrně snadné.

Chřipka probíhá jako celkové onemocnění, které se objevuje náhle po inkubační době trvající krátce po dobu 1 – 3 dnů, s výraznými symptomy, které postihují celé tělo. Mezi příznaky patří především zvýšená tělesná teplota až horečky nad 38 °C, svalová slabost, zimnice, suchý kašel, bolesti hlavy. Rýma nepatří mezi typické příznaky chřipky

[32–34, 36]. Nedojde-li ke komplikacím virózy, onemocnění odezní za 7-10 dní [33]. Chřipkové viry pronikají do těla dýchacími cestami pomocí kapének, ve kterých napadají řasinkový epitel, čímž umožní bakteriím proniknout do okolí a dojde ke vzniku sekundární bakteriální infekce. Jestliže dojde k těžkému průběhu nemoci, může se vyskytnout tracheobronchitida nebo pneumonie [5, 32].

Léčba chřipky bývá obvykle pouze symptomatická, nicméně na trhu jsou dostupná antivirotika amantadin a rimantadin. Prevenci chřipky představuje očkování, kdy očkovací látka se připravuje každý rok z chřipkových kmenů, u kterých je největší riziko nákazy [32].

Pro vyšetření chřipky uvnitř klinického materiálu je vhodné provést odběr ideálně do 3 dnů od propuknutí nemoci, kdy je v těle zastoupeno nejvíce virových částic. K vyšetření se provádí stěr ze zadní strany nosohltanu, který se vytřepe do transportního media. Lepší je však odsát pacientovi sekret z nosohltanu. K izolaci viru a průkazu protilátek se odebírá krev, kterou je vhodné odebrat ještě i za další týden a poté znovu za další týden až 14 dní, kvůli stanovení titru protilátek a sledování jeho změny [5].

K rychlým postupům, jak detekovat viry chřipky v klinickém materiálu, patří elektronová mikroskopie s použitím negativního kontrastu. K průkazu chřipkových antigenů se využívá imunofluorescenčních nebo imunoenzymatických metod. Pomocí Real-Time PCR lze prokázat přítomnost nukleových kyselin. Na ústupu je izolace viru chřipky na tkáňových kulturách a vaječných zárodcích, kde lze pomocí antisér proti hemaglutinům určit kmen chřipky [37].

K průkazu protilátek se využívá komplementfixační reakce, onemocnění chřipkou je potvrzeno, pokud dojde ke čtyřnásobnému vzestupu titru. Vzorek krve je potřeba odebrat co nejdříve po propuknutí nemoci, po prvním týdnu onemocnění nemusí být vzestup titru prokazatelný. Možností je poté výrazný pokles titru protilátek v dalším vzorku, který je vhodné odebrat až za měsíc. KFR se používá obvykle k rozlišení viru chřipky A od viru chřipky B. Dalšími metodami nepřímého průkazu je ELISA a hemaglutinačně inhibiční test, ve kterém dojde k inhibici virové hemaglutinace. HIT se používá k diagnostice chřipkového kmene [5].

### 2.2.2.2 RS-VIRUS

Respirační syncyální virus vytváří velké mnohoaderné buňky zvané syncydia. RS-virus patří mezi velké obalené RNA-viry, které mají spirální symetrii. Má dvě antigeně podobné skupiny A a B. RS-virus nemá neuraminidázu ani hemaglutinin a nedokáže tak shlukovat erythrocyty [5, 32]. RS-virus má nepravidelnou spirální nukleokapsidu, uloženou v obalu s výběžky.

RS-virus je velmi citlivý k vlivům ve svém okolí. Při pokojové teplotě je rychle inaktivován a při chladničkové teplotě již po týdnu ztrácí svou nakažlivost. Pokud chceme RS-virus uchovat, je potřeba ho zmrazit spolu s glycerinem nebo sacharosou na -70 °C [5, 38].

RS-viry u starších dětí a dospělých způsobují pouhé nachlazení a viróza má obvykle mírný průběh, zatímco u novorozenců a kojenců způsobují infekce dýchacích cest, které se projevují jako bronchopneumonie a bronchiolitidy. RS-virózy se často vyskytují jako nozokominální nákazy na novorozeneckých odděleních. Inkubační doba onemocnění se pohybuje mezi 2-8 dny [32]. Mezi první příznaky patří rýma s produkcí serózního sekretu, bolest v krku a nosohltanu, objevuje se kašel. K častým vedlejším příznakům u RS-viróz je zánět Eustachovy trubice a středního ucha. Léčba je pouze symptomatická, u těžkých případů je možné podat ribavirin [5, 32, 33, 39].

Vhodný materiál k vyšetření RS-virózy je odsátý sekret z dolních cest dýchacích, popřípadě výplach z nosu. RS-virus lze ze sputa a sekretů izolovat v průběhu několika dní, u dospělých během 2-3 dnů po nákaze, u dětí 9-11 dnů [33].

K průkazu RS-virů, respektive jejich antigenů v klinickém materiálu, se používá metoda imunofluorescence nebo ELISA. U dospělých se k vyšší citlivosti používá metoda PCR. Pro průkaz protilátek se používá imunofluorescenční metody, popřípadě neutralizační test, který je však pracnější. KFR není u tohoto typu viróz používána, jelikož je metoda poměrně málo citlivá [5, 40, 41].

### 2.2.2.3 METAPNEUMOVIRUS

Metapneumovirus je podobný RS-viru. Způsobuje záněty horních a dolních cest dýchacích, často bývá přítomná infekce středního ucha. K příznakům virózy patří horečka, zimnice, rýma, bolest hlavy a vyrážka. Infekce dolních cest dýchacích probíhají obvykle jako bronchiolitidy [42]. K vyšetření se používá stěr nebo sekret z nosohltanu. Vzhledem k teprve nedávnému popsání tohoto viru se jako nejcitlivější metoda zdá být PCR. Lze však prokázat protilátky proti metapneumoviru metodou ELISA [5, 32, 43].

### 2.2.2.4 ADENOVIRUS

Adenoviry jsou neobalené DNA-viry s kubickou symetrií, jejichž nukleokapsida má tvar dvacetistěnu. Na vrcholcích kapsomer (kapsidových bílkovin) mají výběžky, které se podobají špendlíkům. Tyto výběžky jsou schopné vyvolat shlukování krysích a opičích erytrocytů. Kapsomery mající kulovitý tvar se dotýkají okolních šesti kapsomer, tato uskupení se nazývají hexony. Z vnější strany kapsomery se nachází typově specifické antigeny, zatímco na vnitřní straně hexonu jsou komplementfixační antigeny, které jsou společné pro více jak 40 typů adenovirů. Adenoviry se teoreticky rozdělují na druhy A až F, ale prakticky na serotypy 1 až 51.

Adenoviry jsou poměrně odolné vůči vlivům zevního prostředí, včetně vysychání. Při běžné pokojové teplotě jsou schopny vydržet několik týdnů a v chladničce až v řádech měsíců. Virové částice spolehlivě zničí chlorové nebo aldehydové přípravky. Při dezinfekci rukou alkoholovými prostředky je nutné být obezřetný a nechat přípravek působit delší dobu (až 2 minuty) [5].

Adenovirózy se projevují jako záněty horních a dolních cest dýchacích doprovázené horečkou a někdy zánětem spojivky. Mimo jiné můžou adenoviry vyvolat infekci střev a infekce močových cest [33, 44].

Pro přímý průkaz adenovirů se používají výtěry, výplachy a vzorky sekretů z dýchacích cest, popřípadě vzorky stěru ze spojivky a stolice. Pro nepřímý průkaz je potřeba odebrat vzorek krve a následně druhý vzorek odebrat za 14 dní.

K rychlé diagnostice adenovirózy, respektive adenovirových antigenů, lze využít komerčních setů založených na principu imunochromatografie nebo latexové aglutinace. Skupinový hexonový antigen lze prokázat i pomocí imunofluorescence nebo PCR. U serologických metod je nutné prokázat čtyřnásobný vzestup titru komplementfixačních protilátek namířených proti skupinovému antigenu. Rutinně se využívá ELISA a KFR, u které však může být protilátková odpověď slabší a to především u malých dětí [5, 45].

#### **2.2.2.5 PARAINFLUENZA VIRUS**

Parainfluenza virus patří mezi největší RNA viry se spirální symetrií, který má na svém obalu četné drobné výběžky.

Parachřipka se šíří kapénkovou infekcí a způsobuje u dětí infekce horních dýchacích cest, doprovázené horečkou. U malých dětí vyvolává bronchopneumonie nebo záněty průdušnice a průdušek. Inkubační doba je kolem 1-6 dní [32, 33]. Příznaky onemocnění jsou necharakteristické, viróza probíhá jako infekce horních a dolních cest dýchacích. U zánětů horních cest dýchacích bývá častou komplikací zánět středního ucha. Pro záněty dolních cest dýchacích bývá typická laryngotracheobronchitida [32].

Pro přímý průkaz virů parainfluenzy lze použít stěry z dýchacích cest, ale nejvhodnější je aspirát z nosohltanu a nosu [46]. Parachřipkové antigeny se ve vzorku prokazují pomocí imunofluorescenční metody, k průkazu virové RNA je vhodná metoda Real-Time PCR. Serologického průkazu protilátek proti viru parainfluenzy se příliš nevyužívá. Především průkaz IgM protilátek nebývá moc spolehlivý a nelze spolehlivě určit typ parainfluenza viru, který způsobil probíhající infekci, vzhledem k tomu, že jsou běžné opakované infekce a jsou schopné zvýšit titer protilátek i vůči ostatním typům viru [5].

### 2.2.2.6 RHINOVIRUS A KORONAVIRUS

Infekční rýma nebo také *běžné nachlazení (common cold)* způsobují nejčastěji rhinoviry a koronaviry. Rhinoviry jsou malé neobalené RNA viry s dvacetistěnnou kapsidou. Rhinoviry mají více než 100 serotypů, a z tohoto důvodu míváme rýmu opakovaně. Mezi lidmi se přenášejí kapénkami, ale také kontaktem rukou, na kterých při kýchnutí ulpí nosní sekret. Inkubační doba rhinovirózy je v rozmezí 1-5 dní. Typickými příznaky je rýma se serózním sekretem, bolest hlavy a zvýšená teplota. Diagnostika infekční rýmy způsobené rhinoviry se běžně neprovádí, není potřeba, lze jej však zjistit z výplachu nosu pomocí metody PCR. Serologické metody se nevyužívají, protože existuje mnoho sérotypů a nemusí dojít k výraznému vzestupu titru protilátek [5, 32, 47].

Koronaviry jsou také RNA viry, ale na rozdíl od rhinovirů mají obal s typickými výběžky a jejich tvar připomíná sluneční korunu [5]. Lidské koronaviry jsou v zimě zodpovědné až za dvě třetiny případů nachlazení u dospělých osob. Příznaky kromě časté rýmy bývají nespecifické infekce horních a dolních cest dýchacích. Výjimečně u oslabených osob může dojít k pneumonii. Diagnostika koronavirů se běžně neprovádí a léčba je pouze symptomatická [5, 32, 40].

## 2.3 DIAGNOSTIKA RESPIRAČNÍCH INFEKČÍ

Cílem mikrobiologického vyšetření je určit, který mikrob způsobil sledovanou infekci. Mikroby lze ve vyšetřovaném vzorku identifikovat pomocí přímého a nepřímého průkazu.

Při přímém průkazu pátráme po daném patogenu, který se nachází ve vyšetřovaném vzorku. Prokázat ho můžeme pomocí mikroskopu, ať už světelného nebo elektronového, pomocí kultivačních metod nebo můžeme ve vyšetřovaném vzorku pátrat po složkách typických pro daného mikroba, čímž mohou být antigeny nebo nukleové kyseliny. Přímého průkazu patogenu pomocí pokusu na zvířeti se dnes v praxi využívá jen výjimečně.

U nepřímého průkazu, pátráme po protilátkách, které v organismu zůstaly po infekčním onemocnění [5].

### **2.3.1 MIKROSKOPIE**

Výhodou mikroskopie je rychlost a nízká cena vyšetření, zatím co nevýhodou je citlivost a mikroskopie je leckdy pouze orientační metodou. Abychom mohli mikroba pod mikroskopem sledovat, je potřeba ho něčím zvýraznit (barvou, stříbřením apod.). Mikroskopie nativního preparátu se v praxi téměř nevyužívá. Výjimkou je pozorování v zástinu při identifikace treponemat, která způsobují syfilidu a diagnostika parazitóz a mykóz.

Nejčastěji používaným barvením je barvení dle Grama, méně častějšími barvením jsou barvení na acidorezistentní tyčky (diagnostika tuberkulózy), barvení dle Giemsy (průkaz parazitů) nebo fluorescenční barvení. Mikroby obarvené Gramovým barvením nám poskytnou informaci o tom, zda ve vyšetřovaném vzorku nějaké bakterie jsou, kolik jich tam je, jakou mají velikost, tvar (zda jsou to koky, kokobacily, tyčky nebo mají jiný tvar) a jak jsou navzájem uspořádány (dvojice, shluky, řetízky, atd.). Po obarvení Gramovým barvivem můžeme ve vzorku pozorovat buď modrofialové grampozitivní anebo červeně zbarvené gramnegativní bakterie [5].

#### **2.3.1.1 TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE**

Transmisní elektronový mikroskop umožňuje pozorovat objekty až do tloušťky 100 nm při vysokém zvětšení a s vysokou rozlišovací přesností. TEM se v mnoha věcech podobá klasickému světelnému mikroskopu. Oba typy mikroskopů mají zdroj světla, respektive elektronů, skleněné nebo elektromagnetické čočky a stolek, na který je preparát upevněn. Na rozdíl od světelného mikroskopu má TEM navíc zdroj vysokého napětí, vakuový systém a další. Uvnitř mikroskopu je nutné zabránit náhodným srážkám urychlených primárních elektronů s molekulami vzduchu, které by mohly ovlivnit energii a směr částic, proto je z tohoto důvodu vnitřní prostor vakuován [48, 49].

Každý vzorek musí být nejprve zbaven vody, aby nedocházelo k jejímu bouřlivému vypařování a zpomalení rychlosti elektronů uvnitř mikroskopu. Aby nedocházelo k autodegradaci preparátu je potřeba ho nejdříve zafixovat, čímž se zachová jeho struktura. K fixaci se využívají chemické nebo fyzikální metody. Dalším omezením je tloušťka preparátu, která by neměla přesáhnout 100 nm, jinak by elektrony nedokázaly proniknout celým preparátem, popřípadě by byl výsledný obraz rozmazaný. Vzorky určené pro transmisní elektronový mikroskop lze upravit v podstatě dvěma způsoby, buď přímou anebo nepřímou metodou. Přímá metoda přípravy vzorku spočívá v tom, že se do mikroskopu vloží celý vzorek zbavený vody. Tuto metodu lze však použít pouze u pozorování malých objektů jako jsou buněčné organely, bakterie nebo viry. U nepřímé metody v mikroskopu nepozorujeme originální objekt, ale pouze jeho repliku [48].

V mikrobiologii se využívá metody nepřímého barvení, která je vhodná pro objekty velikosti organel nebo celých buněk. Principem metody je zachycení vzorku na podložní fólii, která je natažena na síťce a následně zalita barvivem z těžkých kovů. Barvivo se následně dostane do okolí buněk a vytvoří tak temné pozadí, zatímco buňky se jeví jako světlé.

Výsledný obraz z transmisního elektronového mikroskopu je uchováván na speciálním fotografickém materiálu nebo v digitální podobě díky CCD kamerám [48].

### **2.3.2 KULTIVACE**

Ač kultivace nepatří mezi nejrychlejší diagnostické metody, v praxi má stále svoje opodstatnění. Výhodou kultivace je její jednoduchost, cena a také možnost dále pracovat s vyizolovaným bakteriálním kmenem. Nevýhodou je bezesporu časová náročnost, kompletní výsledek je možné získat i po několika dnech. Ke kultivaci se lze využít jak půd tekutých (různé bujóny, peptonová voda atd.), které obvykle slouží spíše k pomnožení bakterie, tak půd pevných. Nejhojněji používanou pevnou půdou je krevní agar, a to důvodu, že pokud je tato půda kultivována v prostředí se zvýšenou tenzí oxidu uhličitého, roste na ní většina lékařsky významných mikrobů [5, 50].

Výběr kultivačních půd záleží na místě odběru vyšetřovaného vzorku (jiné sady se používají u respiračních infekcí, jiné u infekcí trávicího traktu, močových infekcí atd.), kultivačních nárocích bakterie (aerobní/anaerobní prostředí, přítomnost ATB apod.) a tak dále [5].

### **2.3.3 BIOCHEMICKÉ TESTY**

Ne vždy se se podaří mikroba identifikovat na základě mikroskopie a kultivace, proto si mikrobiolog může svou domněnku potvrdit také biochemickými testy. Principem biochemických testů je reakce substrátu s mikrobiálním enzymem za vzniku produktu, který má odlišnou barvu, popřípadě konzistenci než původní substrát. V některých případech musíme k produktu přidat vhodný indikátor, který produkt znázorní. Z důvodu úspory času jsou velmi výhodné rychlé biochemické testy, kde je výsledek vidět již za několik sekund nebo minut. Do rychlých biochemických testů patří například katalasový test nebo testy s diagnostickými proužky, které mění barvu (oxidázový test, PYR-test a další). Další skupinou testů jsou testy prováděné ve zkumavkách, na odečtení výsledků si však musíme počkat několik hodin nebo den. Tyto testy nám mohou prozradit, zda daný mikrob dokáže fermentovat cukry, tvořit plyny, štěpit specifický substrát nebo se dokáže pohybovat [3, 5].

### **2.3.4 DETEKCE ANTIGENU**

Pokud chceme ve vyšetřovaném vzorku prokázat bakteriální antigen, je nutné mít proti tomuto antigenu známou protilátku. Protilátky mohou být namířeny proti vícero epitopům antigenu, pak se jedná o polyklonální protilátky anebo pouze proti jedné antigenní determinantě, jak je tomu u protilátek monoklonálních. K průkazu ve vzorku se využívá aglutinačních, imunoenzymatických (ELISA) nebo imunofluorescenčních metod [3, 5].

### 2.3.5 DETEKCE PROTILÁTEK

Detekce protilátek patří mezi nepřímý průkaz původce infekce, protože nezjišťujeme patogen jako takový, ale pouze reakci imunitního systému na něj, čili protilátky. Abychom však infekci mohli potvrdit, musíme dokázat, že během probíhajícího onemocnění se protilátky teprve objevily nebo se významně zvýšilo jejich množství. Mezi serologické reakce patří například aglutinace, precipitace, komplementfixační reakce, neutralizační reakce atd. Mezi další metody průkazu protilátek patří i reakce se značenými složkami, kam patří ELISA, imunofluorescence a imunoblot [3, 5].

### 2.3.6 PCR

Polymerázová řetězová reakce se začíná čím dál více rutinně využívat v mikrobiologických laboratořích. Je vhodná především tam, kde má patogen dlouhou kultivační dobu, špatně se kultivuje a jeho určení je velmi obtížné [5].

PCR reakce probíhá na principu amplifikace (zmnožení) specifické části DNA. Celá reakce je složena ze tří kroků – denaturace, hybridizace a elongace a tyto kroky se pak několikrát za sebou opakují. Všechny tyto kroky probíhají v termocykleru, který dokáže automaticky regulovat teplotu mezi jednotlivými fázemi. Během denaturace nejprve dochází k rozdělení dvouvláknové DNA, na níž působí vysoká teplota (cca 95 °C). Při hybridizaci nejprve dojde k ochlazení reakční směsi a poté se na specifická místa na vláknech DNA navážou primery. PCR primery jsou malé části jednovláknové DNA, které mají délku okolo 20 nukleotidů. V každé PCR jsou použity dva primery, tak aby ohraničovaly specifickou oblast DNA, která se má amplifikovat. V poslední fázi, tedy elongaci, se díky enzymu *Taq* polymerázy (izolována z bakterie *Thermus aquaticus*) a oligonukleotidů, které musí být v reakci v přebytku, se primery prodlužují a vznikají tak nové komplementární řetězce. Na začátku jsme tedy měli pouze jeden dvouvláknový řetězec DNA a na konci reakce jsou už řetězce dva. Nově vzniklé amplikony (produkty) jsou v dalším cyklu použity jako matrice pro vznik dalších kopií hledané DNA. Po každém

proběhnutí těchto tří kroků tak exponenciálně narůstá množství DNA ve zkumavce. Počet cyklů bývá kolem 30.

Nespornou výhodou této metody je možnost detekce původně malého množství bakteriální DNA ve vyšetřovaném vzorku a také čas, výsledek můžeme vědět již za pár hodin [3, 51–53].

V klinické mikrobiologii se nejčastěji používá Real-Time PCR, která umožňuje kvantifikaci DNA produktu v reálném čase. Abychom mohli detekovat nárůst množství produktu, jsou primery označené různými fluorescenčními barvivy [54, 55].

### 3 CÍLE PRÁCE

Praktická část diplomové práce je zaměřena na sběr vzorků od pacientů s infekcemi dýchacích cest. Cílem je ve vzorcích detekovat metodou Real-Time PCR DNA *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* a *Chlamydia pneumoniae*. Několik vzorků bude zpracováno metodou negativního barvení pro znázornění bakterií a virových částic a poté prohlédnuto pod transmisním elektronovým mikroskopem. Odběru vzorku předcházelo vyplnění dotazníku, ve kterém jsou uvedeny příznaky infekce a případná terapie. Výsledky těchto dotazníků budou v práci statisticky vyhodnoceny.

## 4 METODIKA

### 4.1 VZORKY

Odběr vzorků probíhal od podzimu roku 2016 do jara 2017 a poté od podzimu 2017 až do jara 2018. Vzorky pocházely od dobrovolníků a pacientů obvodních lékařů, kteří se do studie zapojili.

### 4.2 IZOLACE DNA

Po odebrání vzorku byl stěrový tampon zalomen do zkumavky s lyzačním roztokem a až do dalšího zpracování byl uchováván ve tmě.

Bakteriální DNA obsažená ve vzorku z výtěru krku byla izolována pomocí přístroje Chemagic Prepito-D, jehož princip izolace nukleových kyselin je založen na použití magnetických částic. Vzorky z výtěru z krku byly pro izolaci připravovány podle následujícího postupu:

1. Pomocí pinzety se uchopil zalomený výtěrový tampon, ze kterého se o stěny zkumavky setřelo co nejvíce roztoku, a poté byl tampon vyhozen.
2. Do zkumavky s 450  $\mu$ l lyzačního roztoku bylo přidáno 200  $\mu$ l PCR vody, 20  $\mu$ l IC DNA (interní kontrola) a nakonec 10  $\mu$ l proteinázy K.
3. Směs ve zkumavce byla po dobu 20 minut inkubována při 65 °C na termotřepačce při 700 otáčkách.
4. Směs ve zkumavce byla přepipetována do destičky do první řady.
5. Do mikrozkušavky v první pozici Tip and Tube Rack bylo napipetováno 50  $\mu$ l Elution Buffer
6. Do mikrozkušavky v druhé pozici Tip and Tube Rack bylo napipetováno 150  $\mu$ l Magnetics Beads
7. Do třetí pozice Tip and Tube Rack byl vložen příslušný počet jednorázových špiček určených pro Chemagic Prepito-D.
8. Destička byla vložena do izolátoru a byl spuštěn program

#### 4.3 REAL-TIME PCR DETEKCE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*, *MYCOPLASMA PNEUMONIAE* A *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE*

K detekci bakteriální DNA *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* a *Chlamydomphila pneumoniae* metodou Real-Time PCR byly použity soupravy EliGene® Legionella pneumophila UNI, EliGene® Mycoplasma pneumoniae UNI a EliGene® Chlamydomphila pneumoniae UNI. Každá sada obsahuje UNI Mix, PC DNA, IC DNA 01, Eli Blocker (pro LightCycler® 2.0) a ROX dye (pro ABI přístroje) pro danou vyšetřovanou bakterii.



**Obr. 1:** EliGene® *Legionella pneumophila* UNI – sada pro detekci legionely

Principem diagnostické soupravy je Real-Time PCR s použitím hybridizačních sond (Molecular Beacons hybridization probes). Detekce *L. pneumophila*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* a interní kontroly je uskutečněna pomocí primerů a značené sondy.

Pro *L. pneumophila*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* je použita sonda značená FAM barvou a pro interní kontrolu je použita sonda značená HEX barvou.

Do jamek reakční destičky bylo napipetováno 5 µl *L. pneumophila* UNI Mixu, *M. pneumoniae* UNI Mixu nebo *C. pneumoniae* UNI Mixu a 5 µl izolované DNA (dohromady tedy 20 µl v jedné jamce).

Do jamky s pozitivní kontrolou bylo přidáno 15 µl UNI Mixu dané bakterie a 5 µl PC DNA vyšetřované bakterie.

Jamka s negativní kontrolou obsahovala 15 µl UNI Mixu vyšetřované bakterie a 5 µl PCR vody.

PCR reakce proběhla v termocykleru LightCycler 480 od firmy Roche, kde byl nastaven tento teplotní profil, který byl stejný pro *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* a *Chlamydomphila pneumoniae*:

1. Step 1 – Analysis mode „None“, 1 Cycle

95 °C	3 minuty	Ramp rate (4.4 °C/s)	Acquisition mode „None“
-------	----------	----------------------	-------------------------

2. Step 2 – Analysis mode „Quantification“, 50 Cycles

95 °C	5 s	Ramp rate (4.4 °C/s)	Acquisition mode „None“
-------	-----	----------------------	-------------------------

55 °C	20 s	Ramp rate (2.2 °C/s)	Acquisition mode „Single“
-------	------	----------------------	---------------------------

72 °C	10 s	Ramp rate (4.4 °C/s)	Acquisition mode „None“
-------	------	----------------------	-------------------------

3. Step 3 – Analysis mode „None“, 1 Cycle

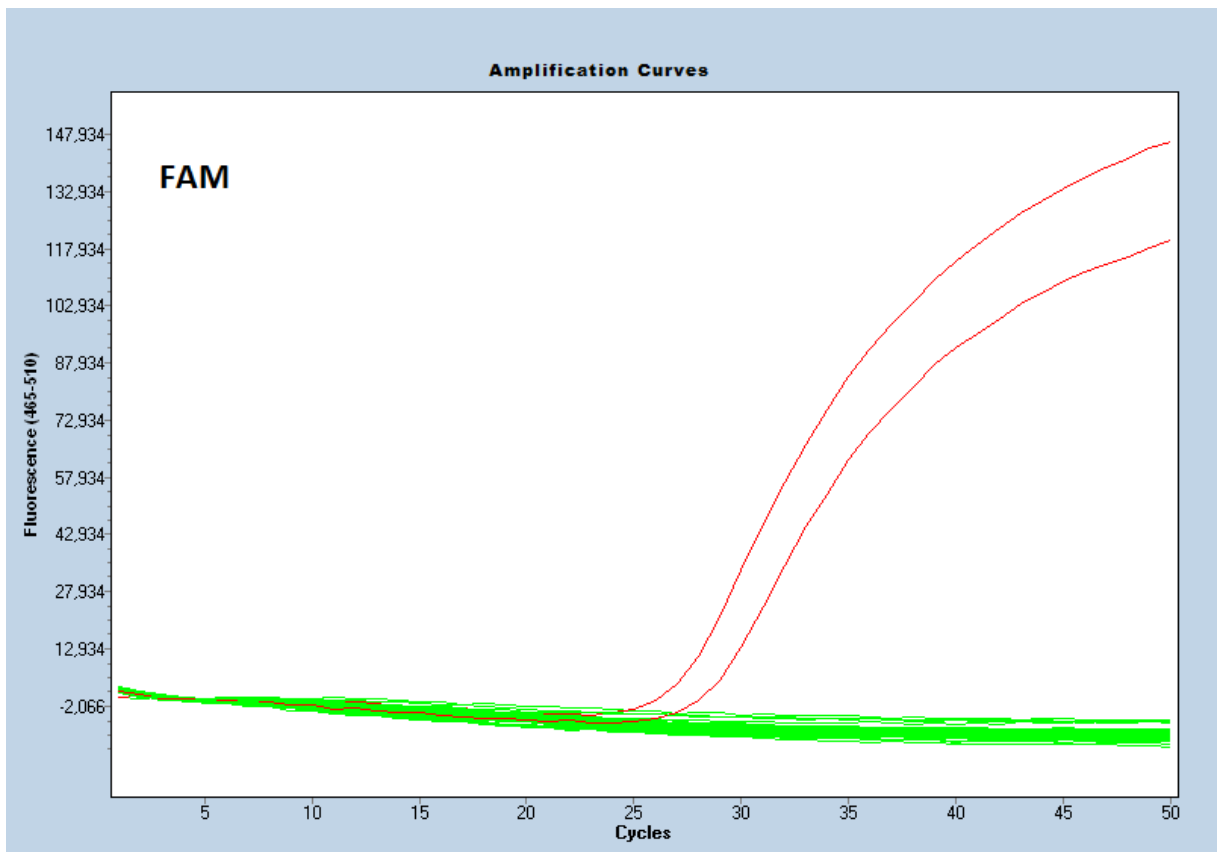
40 °C	1 minuty	Ramp rate (2.2 °C/s)	Acquisition mode „None“
-------	----------	----------------------	-------------------------

V případě pozitivního výsledku pro *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* nebo *Chlamydomphila pneumoniae* dojde k amplifikaci produktu a tím i nárůstu signálu ve FAM kanálu. Amplifikační signál se objeví před 45. cyklem.

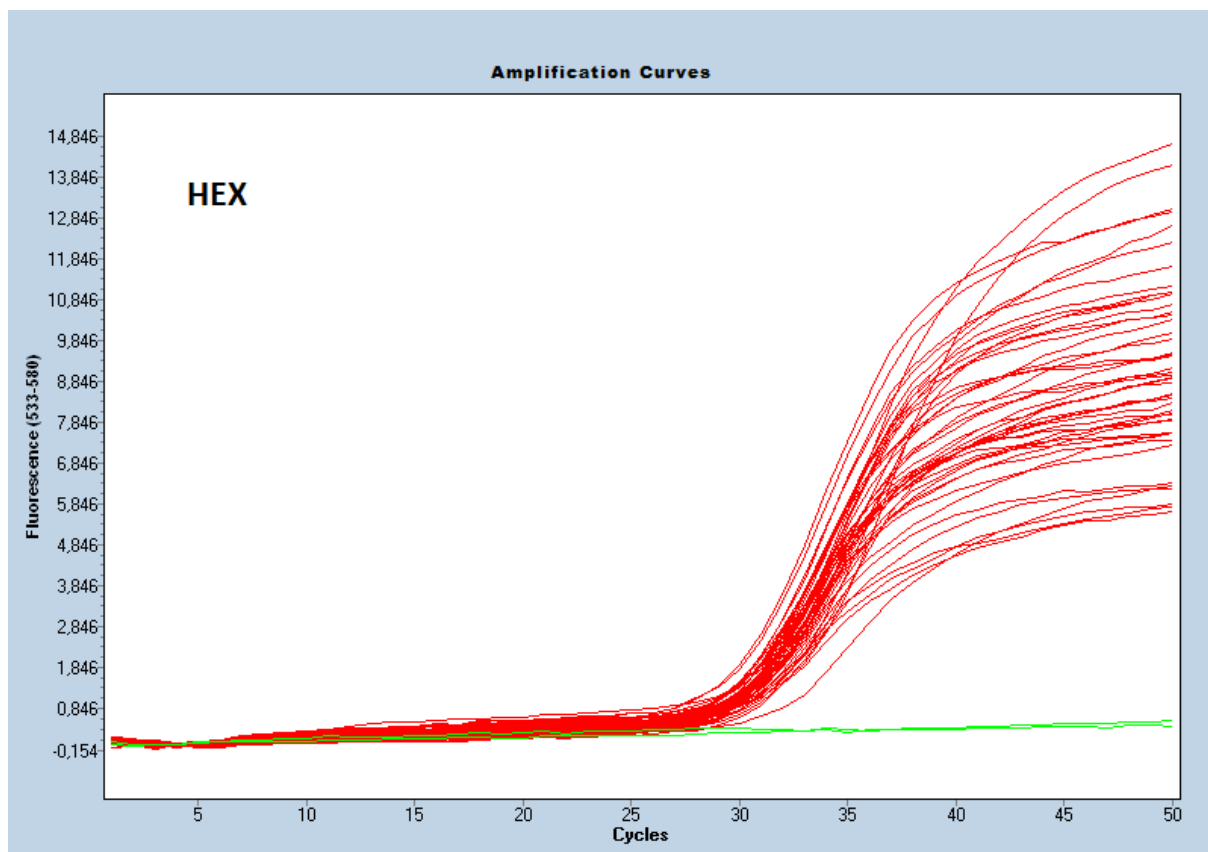
Jestliže ve vzorku nebyla přítomna DNA *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* nebo *Chlamydomphila pneumoniae*, nedošlo k amplifikaci a tím pádem ani k nárůstu signálu ve FAM kanálu. Negativní výsledek však nevylučuje přítomnost infekce

způsobené *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* a *Chlamydophila pneumoniae*, protože výsledek závisí na sběru vzorku, jeho zpracování a obsahu dostatečného množství bakteriální DNA. Interní kontrola musí být amplifikována vždy, amplifikace se projeví nárůstem signálu v HEX kanálu. Pokud by nedošlo k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu FAM specifického pro DNA *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* a *Chlamydophila pneumoniae*, ani v kanálu HEX pro Interní kontrolu, musí se analýza zopakovat znovu a ideálně s nově izolovanými vzorky. Interní kontrola ukazuje kvalitu izolace DNA a detekuje případné chyby během izolace DNA. Pozitivní kontrola ukazuje na kvalitu MasterMixu.

Senzitivita i specificita EliGene® *Legionella pneumophila* UNI Kitu, EliGene® *Mycoplasma pneumoniae* UNI Kitu i EliGene® *Chlamydophila pneumoniae* UNI Kitu je 100%. Všechny 3 soupravy pro detekci *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* a *Chlamydophila pneumoniae* dokáží detekovat  $10^1$ - $10^8$  vyšetřované bakteriální DNA molekul v reakční směsi.



**Obr. 2:** Vyhodnocení Real-Time PCR detekce bakterie. Ve FAM kanálu je červeně vyznačena pozitivní amplifikační křivka, v tomto případě jsou zde 2 pozitivní amplifikační křivky, jedna patří pozitivní kontrole a druhá patří vzorku. Negativní amplifikační křivky mají zelenou barvu.



**Obř. 3:** *Vyhodnocení Real-Time PCR detekce bakterie. V HEX kanálu jsou vidět amplifikační křivky Interních kontrol. Na obrázku jsou vidět zelené přímky vzorků, u kterých nedošlo k amplifikaci. U vzorků, kde nedošlo k amplifikaci Interních kontrol, byla analýza provedena znovu a tentokrát už došlo k jejich amplifikaci.*

#### 4.4 ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

Před samotným výtěrem byl výtěrový tampon navlhčen ve fyziologickém roztoku, aby nedošlo k vsáknutí vzorku do vnitřku tamponu, kde by se virové částice mohly zachytit. Po setření krční sliznice byl výtěrový tampon zalomen do zkumavky s 90  $\mu$ l fyziologického roztoku a následně byla zkumavka uložena do lednice, případně mrazáku, než proběhlo zpracování vzorku.

Vzorky z výtěrů z krční sliznice byly resuspendovány v PBS a poté byla suspenze nanesena na hodinové sklíčko. Na tuto suspenzi byla přiložena síťka potažená formvarovým filmem a uhlíkem (Agar Scientific, Austria). Po 2 minutách byla síťka pinzetou ze suspenze odebrána a zbytky vody ve vzorku byly vysušeny proužkem filtračního papíru. Následně byla na síťku kápnuta kapka 1%  $\text{NH}_4\text{MoO}_4$ , po několika sekundách působení molybdanu byl zbytek barviva znovu vysušen filtračním papírkem. Takto připravený vzorek metodou negativního barvení byl prohlížen pod elektronovým mikroskopem Philips 208S MORGAGNI ( FEI, Česká republika ) při zvětšení 14 000 x a při urychlovacím napětí 80kV.

Nevýhodou této metody je, že viry lze ve vzorku zachytit zhruba během 1-3 dnů po vypuknutí onemocnění, vzorek by měl být nejlépe odebrán, když má pacient horečku. Další nevýhodou je citlivost metody, v 1 ml vzorku musí být alespoň  $10^6$  virových částic.

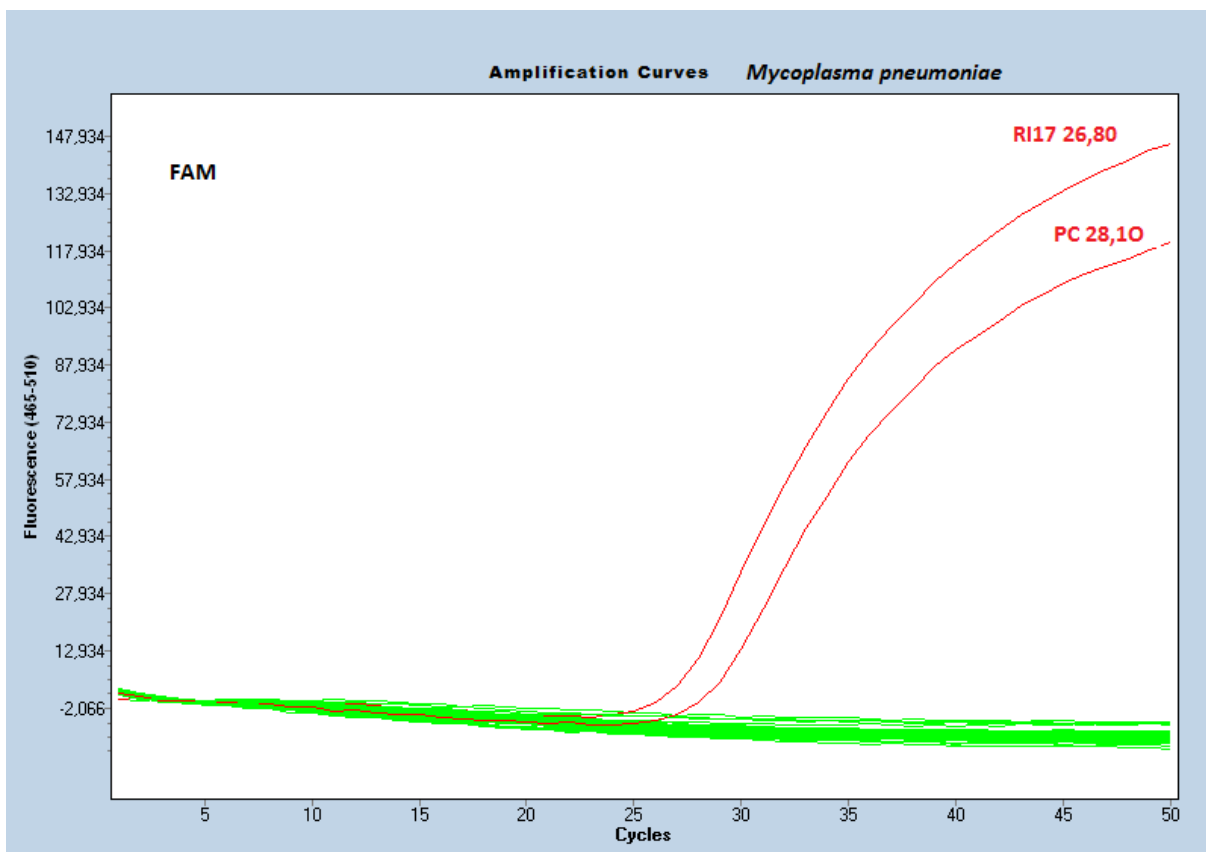
## 5 VÝSLEDKY

Dohromady bylo zpracováno 92 vzorků výtěrů z krku od pacientů a dobrovolníků s infekcí dýchacích cest. Od podzimu 2016 do jara 2017 bylo od praktických lékařů v Brně sebráno celkem 56 vzorků. Další sběr probíhal od prosince 2017 až do konce března 2018, kterého se zúčastnilo 36 dobrovolníků.

### 5.1 REAL-TIME PCR DETEKCE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*, *MYCOPLASMA PNEUMONIAE* A *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE*

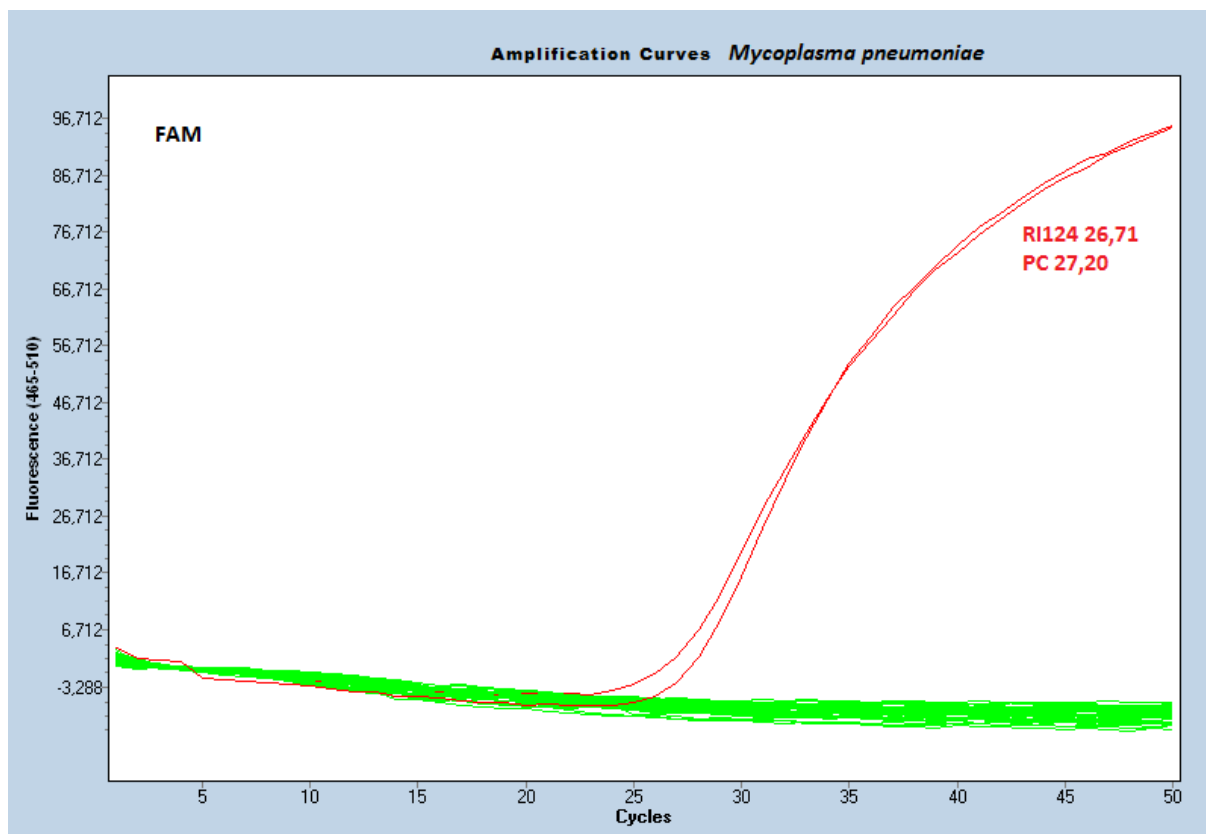
Ze všech 92 vzorků výtěrů z krku byla vyizolována DNA a následně provedena PCR analýza s detekcí bakterií *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* a *Chlamydophila pneumoniae*.

Při PCR detekci *Legionella pneumophila* a *Chlamydophila pneumoniae* nebyl zjištěn žádný pozitivní vzorek. Byly však zaznamenány 2 vzorky, u nichž došlo k nárůstu amplifikačního signálu před 45. cyklem, lze je tedy označit za pozitivní na bakterii *Mycoplasma pneumoniae*. Jeden pozitivní vzorek pocházel od pacienta z první sady vzorků, které byly sbírány praktickými lékaři, a druhý pozitivní vzorek pocházel od dobrovolníka z druhé sady vzorků.



**Obr. 4:** Pozitivní vzorek při Real-Time PCR analýze bakterie *Mycoplasma pneumoniae*

Na obrázku číslo 4 je záznam z průběhu Real-Time PCR, kde jsou v kanále FAM vidět dvě pozitivní amplifikační křivky, které jsou značené červeně. Jedna pozitivní amplifikační křivka patří vzorku, kde došlo k nárůstu amplifikačního signálu po 26. cyklu a druhá pozitivní kontrole, kde došlo k nárůstu po 28. cyklu. U ostatních vzorků nedošlo k nárůstu amplifikačního signálu, jsou značeny zeleně, vzorky jsou tedy negativní na přítomnost bakterie.



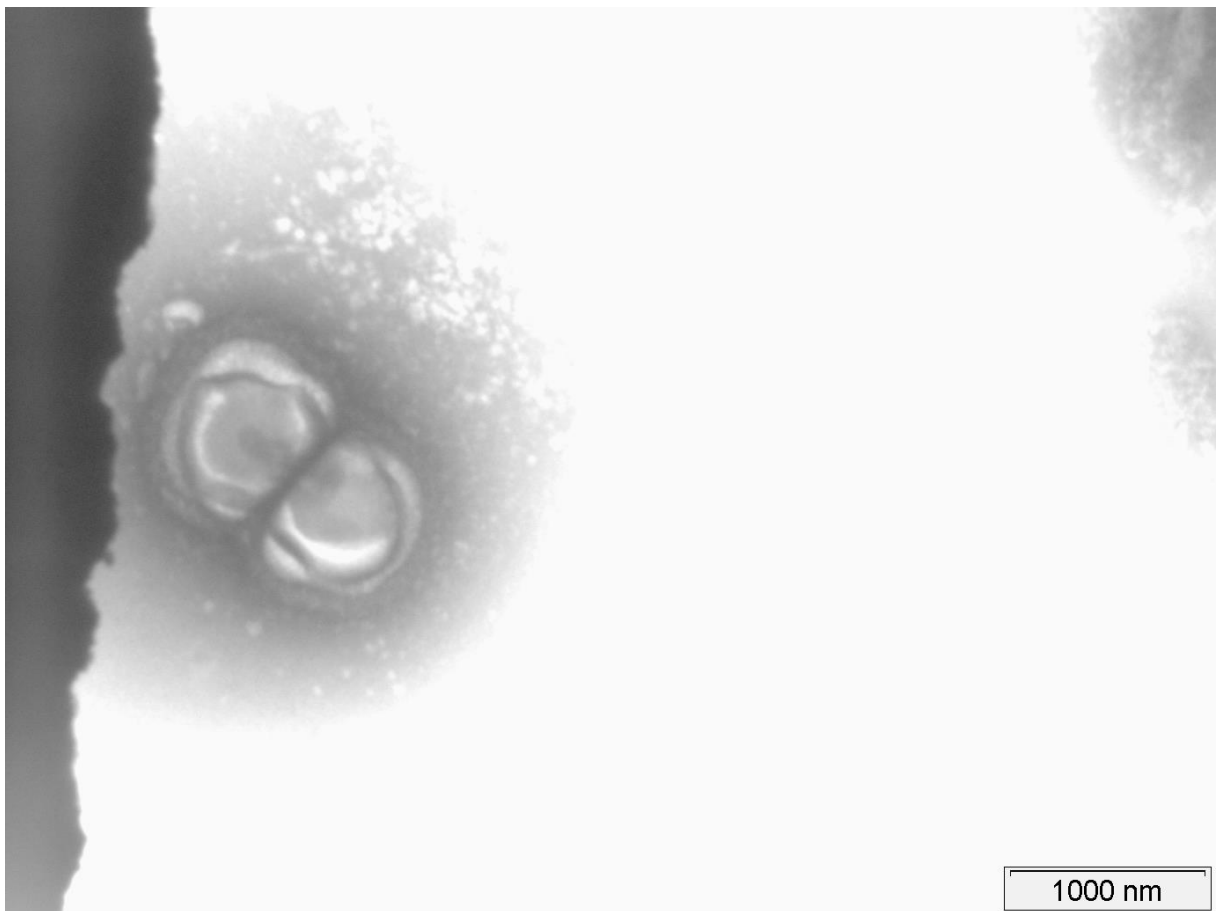
**Obr. 5:** Pozitivní vzorek při PCR analýze bakterie *Mycoplasma pneumoniae*

Stejně jako na předchozím obrázku jsou i na obr. 5 v kanále FAM vidět dvě pozitivní amplifikační křivky, které jsou značené červeně. Jedna pozitivní amplifikační křivka patří vzorku, kde došlo k nárůstu amplifikačního signálu po 26. cyklu a druhá pozitivní kontrole, kde došlo k nárůstu po 27. cyklu. Negativní vzorky jsou opět značeny zeleně, u nich nedošlo k žádnému nárůstu signálu.

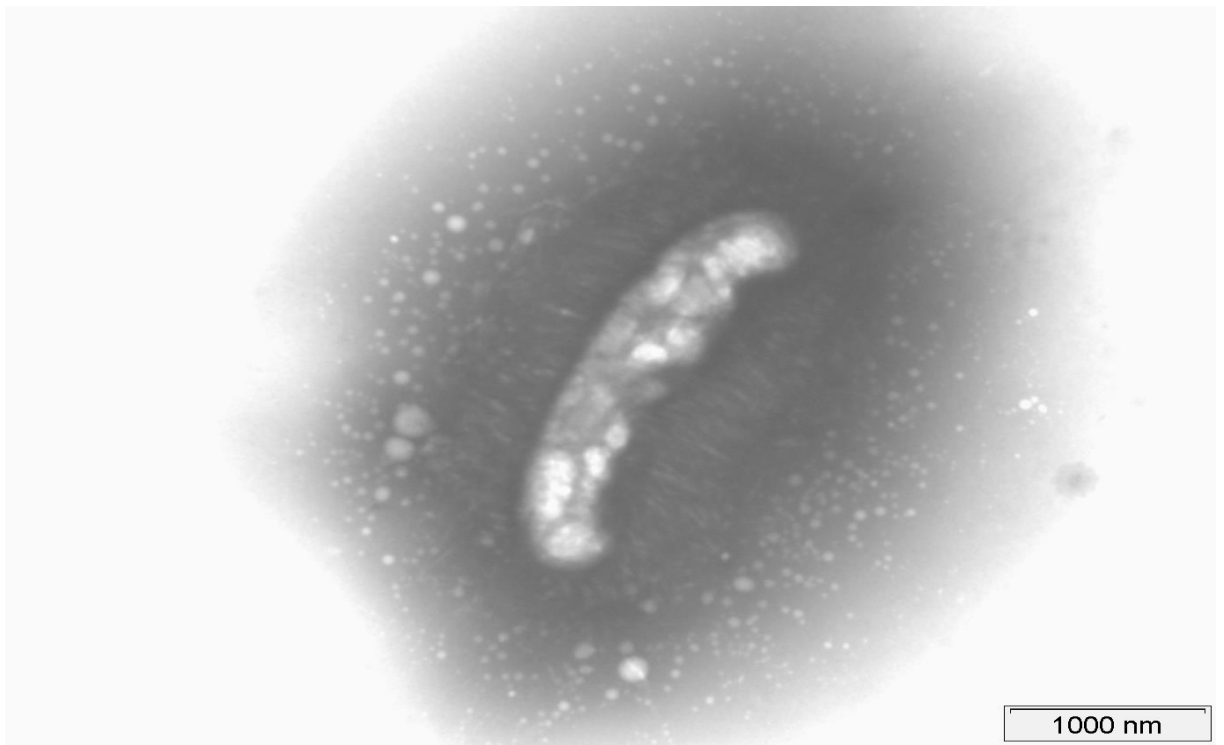
## 5.2 ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

Při sběru vzorků výtěrů z krku, který proběhl na konci roku 2017 a začátku roku 2018, bylo kromě výtěru krku na izolaci DNA a následnou Real-Time PCR analýzu udělán i vzorek výtěru krku, který byl obarvený metodou negativního kontrastu a následně byl prohlédnut pod transmisním elektronovým mikroskopem. Pod mikroskopem bylo prohlédnuto 8 vzorků. 7 vzorků bylo odebráno prvním dobrovolníkům naší studie, poslední, tedy osmý vzorek byl odebrán muži s horečkou, u kterého byla větší

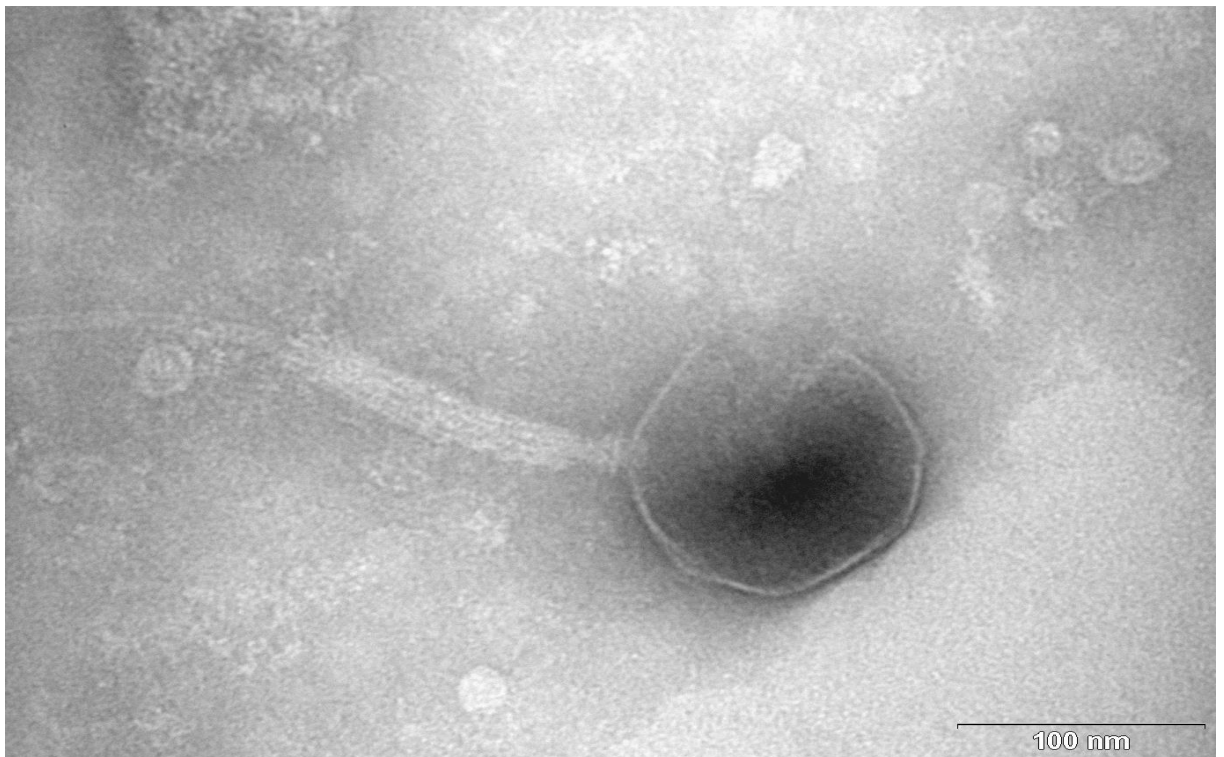
pravděpodobnost zachytit případné virové činitele, pokud by byla infekce virového původu. Cílem tohoto vyšetření bylo zjistit, zda se ve vzorku nevyskytují nějaké virové činitele, virové částice se však nepodařilo najít v žádném vzorku. U všech vzorků byly zjištěny blíže neklasifikované bakterie, které mohly být původcem infekce, avšak také mohly být součástí přirozené mikroflóry. Mezi nalezenými koky by mohly být bakterie rodu *Streptococcus* (např. *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitis*. Z tyček bychom mohli identifikovat například bakterie, jako jsou *Haemophilus influenzae* a *Klebsiella pneumoniae*. A samozřejmě bychom mohli najít bakterie *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* a *Chlamydia pneumoniae*. U většiny vzorků byly nalezeny bakteriofágy. U žádného z vzorků prohlížených pod elektronovým mikroskopem nebyla metodou Real-Time prokázána infekce způsobená *L. pneumophila*, *M. pneumoniae* ani *C. pneumoniae*



**Obr. 6:** Fotografie z elektronového mikroskopu, na které je zachycena dvojice koků (diplokok)



**Obr. 7:** *Fotografie z elektronového mikroskopu, na které je zachycena tyčkovitá bakterie*



**Obr. 8:** *Fotografie z elektronového mikroskopu, na které je zachycen bakteriofág*

Na obrázcích (Obr.) 6 – 8 jsou pro ukázkou fotografie z transmisního elektronového mikroskopu. Více fotografií je uvedeno v příloze k jednotlivým vyšetřeným vzorkům.

První vzorek, zpracovaný metodou negativního barvení a následně prohlížený pod transmisním elektronovým mikroskopem, patřil 20leté ženě nekuřačce. Žena do dotazníku uvedla zvýšenou teplotu 37,2 °C, bolest v krku, vykašlávání purulentního sputa, zvětšení krčních uzlin a rýmu s produkcí žlutozeleného sekretu. Bolest na plicích a užívání antibiotik žena negovala. V preparátu byly nalezeny koky i tyčky, jedna z tyček měla bičík. V příloze 1 jsou přiloženy snímky z elektronového mikroskopu.

Druhý vzorek byl od sedmadvacetileté ženy nekuřačky. Žena měla běžnou tělesnou teplotu (nižší než 37 °C), zvětšené krční uzliny, bolest v krku, suchý kašel a rýmu s purulentní sekrecí hlenu. Žena nepociťovala žádnou bolest na plicích. Nemocná užívala antibiotikum Augmentin (délka užívání nebyla uvedena). V preparátu nebyly téměř žádné bakterie, pravděpodobně nebyla setřena dostatečná část krční sliznice. Opět byly přítomné bakteriofágy. V příloze 2 jsou přiloženy fotografie z TEM.

Třetí preparát, který byl prohlédnut pod mikroskopem, byl zhotoven z výtěru krční sliznice 29leté ženy nekuřačky. Žena měla běžnou tělesnou teplotu, kromě bolesti v krku pociťovala taktéž bolest na plicích. Žena měla suchý kašel a rýmu s produkcí žlutozeleného hlenu, krční uzliny nebyly zvětšené. Před odběrem žena nebrala žádná antibiotika. V preparátu byly nalezeny bakterie, a to jak koky (diplokoky), tak tyčky, snímky některých nalezených bakterií jsou v příloze 3.

Čtvrtý vzorek byl odebrán 33letému muži nekuřákovi s běžnou tělesnou teplotou. Muž do dotazníku uvedl, že má následující příznaky – bolest na plicích, kašel s vykašláváním žlutozeleného sputa, produkce žlutozeleného nosního sekretu. Záporně odpověděl na bolest v krku a užívání antibiotik. Při prohlížení mikroskopem byly v preparátu nalezeny bakterie, mimo jiné shluky tyček, a bakteriofágy. Snímky ze čtvrtého preparátu jsou v příloze 4 na konci práce.

Pátý vzorek poskytla 38letá žena nekuřačka. Žena neměla zvýšenou teplotu, netrpěla bolestí v krku ani na plicích. Při kašli žena vykašlávala sputum žlutozelené barvy. Žena do dotazníku uvedla přítomnost rýmy, nosní sekret byl čirý. Před odběrem vzorku nebyla žena léčena žádnými antibiotiky. V preparátu byly kromě bakterií přítomné i bakteriofágy, které jsou také zachyceny na snímcích v příloze 5.

Šestý vzorek byl výtěr z krku provedený sedmadvacetileté ženě nekuřačce. V době odběru měla žena horečku (38 °C), bolelo ji v krku, měla zvětšené krční uzliny a kašel, při kterém vykašlávala čiré sputum. Žena negovala bolest na plicích, rýmu a probíhající léčbu antibiotiky. V příloze 6 jsou snímky z prohlížení preparátu, při kterém byly nalezeny bakterie – koky (diplokoky) a tyčky.

Sedmý preparát byl udělán z výtěru krku šestačtyřicetileté ženy nekuřačky, která měla mírně zvýšenou tělesnou teplotu (37 °C). Žena nepociťovala bolest v krku ani na hrudi, neměla zvětšené krční uzliny a nebrala žádná antibiotika. Trápil ji však suchý kašel a rýma s produkcí čirého sekretu. V preparátu byly kromě bakterií nalezeny i bakteriofágy (viz příloha 7).

Poslední, osmý, preparát byl zhotoven ze stěru krční sliznice 74letého muže nekuřáka, který měl tělesnou teplotu 38,2 °C. Z příznaků uvedl do dotazníku pouze kašel s vykašláváním mukózního sputa a rýmu se sekrecí čirého sekretu. Muž nepociťoval žádnou bolest v krku ani na plicích, neměl zvětšené uzliny a v době odběru nebyl léčen žádnými antibiotiky. Stejně jako u většiny předchozích preparátů, byly i zde pozorovány bakterie a bakteriofágy. Pořízené snímky jsou uvedeny v příloze 8.

Preparát č.	Pohlaví	Věk	Tělesná teplota:	Kouření	Kašel	Vykašlávání sputa	Charakter sputa
1	žena	20	37,2 °C	ne	ano	ano	purulentní
2	žena	27	<37 °C	ne	ano	ne	-
3	žena	29	<37 °C	ne	ano	ne	-
4	muž	33	<37 °C	ne	ano	ano	purulentní
5	žena	38	<37 °C	ne	ano	ano	purulentní
6	žena	27	38 °C	ne	ano	ano	čirý
7	žena	46	37 °C	ne	ano	ne	-
8	muž	74	38,2 °C	ne	ano	ano	čirý

Preparát č.	Bolest v krku:	Bolest na plicích:	Zvětšené krční uzliny:	Smrkání:	Charakter hlenu:	ATB terapie:
1	ano	ne	ano	ano	žlutý/zelený	ne
2	ano	ne	ano	ano	žlutý/zelený	ano
3	ano	ano	ne	ano	žlutý/zelený	ne
4	ne	ano	ne	ano	žlutý/zelený	ne
5	ne	ne	ne	ano	čirý	ne
6	ano	ne	ano	ne	-	ne
7	ne	ne	ne	ano	čirý	ne
8	ne	ne	ne	ano	čirý	ne

**Obr. 9:** Tabulka s údaji z dotazníků

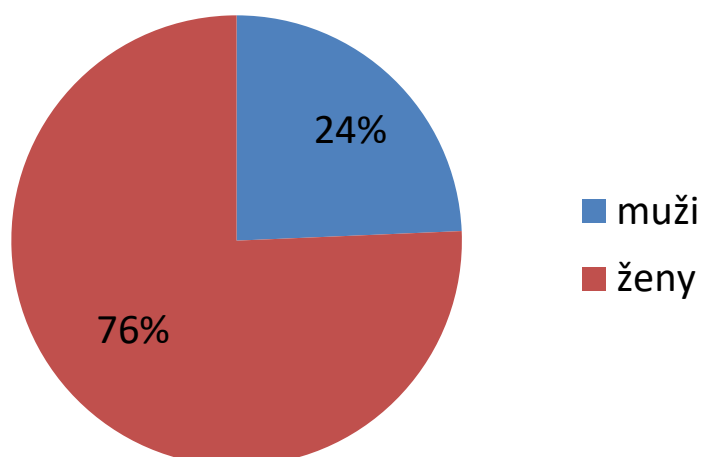
### 5.3 ZPRACOVÁNÍ DOTAZNÍKŮ

Před tím, než byl u pacienta nebo dobrovolníka udělán výtěr krku, byl s ním nejprve vyplněn dotazník, kde bylo uvedeno:

- pohlaví
- věk
- kouření
- tělesná teplota
- bolest v krku
- bolest na plicích
- kašel
- vykašlávání sputa
- charakter sputa (serózní, mukózní, purulentní)
- zvětšené krční uzliny
- smrkání
- charakter hlenu (čirý, žlutý/zelený)
- ATB terapie
- jiná léčiva

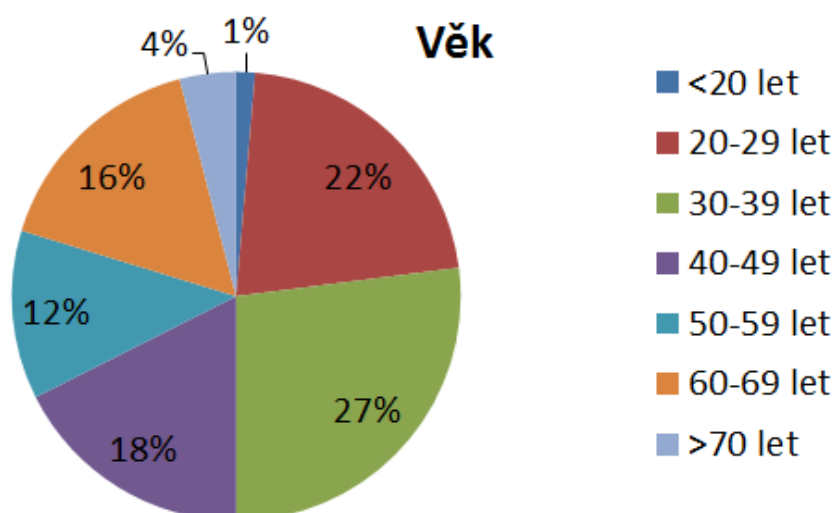
V dotaznících, které vyplňovali lékaři s pacienty, bylo navíc uvedeno i poslechový nález, přítomnost čepů na mandlích, diagnóza a případná změna antibiotické terapie při další kontrole. Oproti dotazníkům z dalšího sběru vzorků od dobrovolníků chyběly záznamy o bolesti krku a bolesti na plicích. Celkem bylo zpracováno 74 dotazníků (38 od lékařů a 36 dotazníků od dobrovolníků), bohužel k 18 vzorkům nám lékař dotazníky nedodal.

## Pohlaví

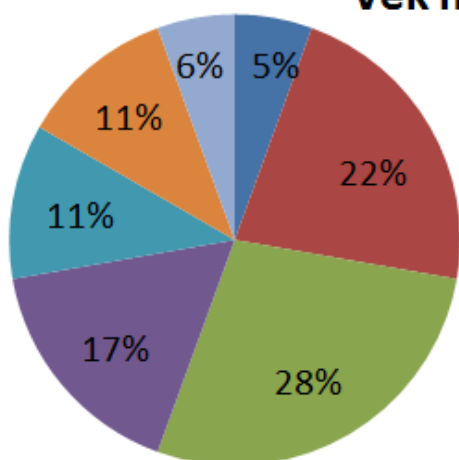


Obr. 10: Graf s procentuálním zastoupením mužů a žen

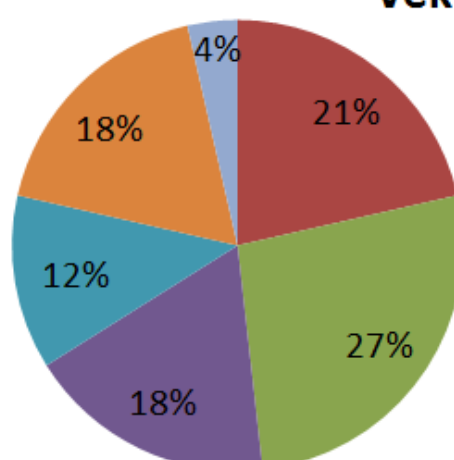
## Věk



## Věk mužů

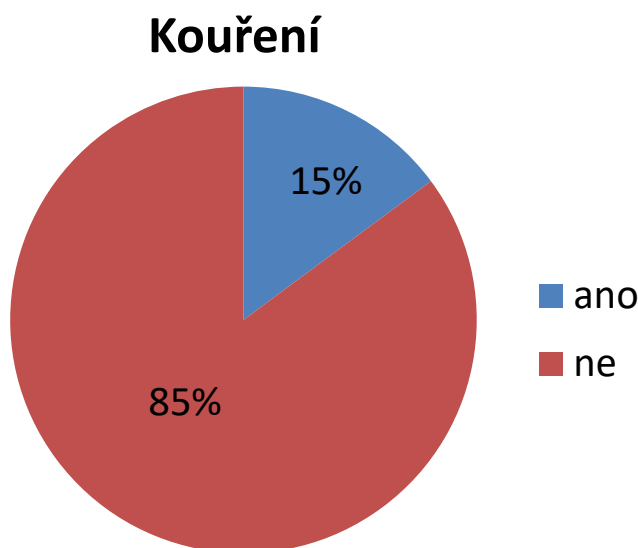


## Věk žen



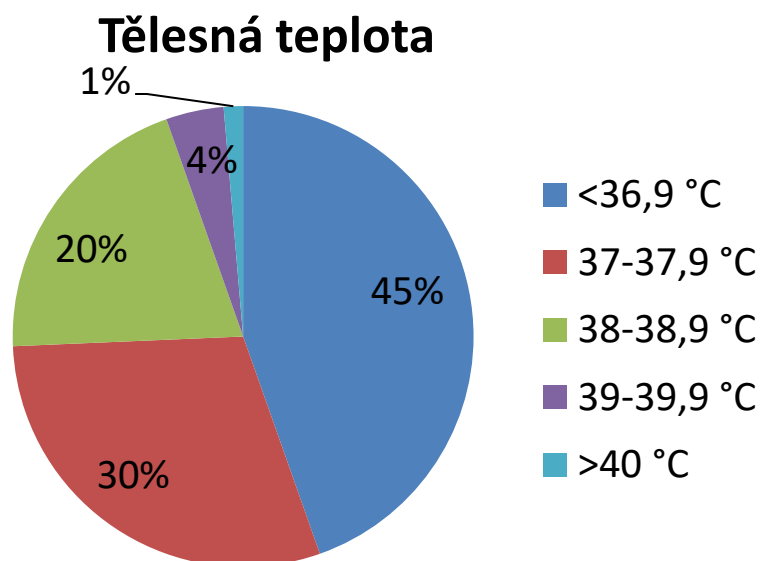
Obr. 11: Graf s procentuálním zastoupením věkových kategorií pro dané pohlaví

Na obr. 10 můžeme z koláčového grafu odečíst procentuální zastoupení mužů a žen, kde je patrné, že vzorků pocházejících od žen (56) bylo třikrát více než od mužů (18). Koláčové grafy na obr. 11 ukazují procentuální zastoupení věkových kategorií u mužů, žen a všech osob, kterým byl udělán výtěr krku. Nejpočetnější skupinou byli lidé v rozmezí 30 až 39 let. Procentuální zastoupení stejných věkových kategorií bylo u mužů a žen téměř shodné, největší procentuální rozdíl mezi muži a ženami byl u osob mladších 20 let a osob starších 60 let, tyto skupiny současně patřily mezi nejméně zastoupené. Průměrný věk byl 42,6 let, průměrný věk mužů byl 41 let a žen 43,6 let.



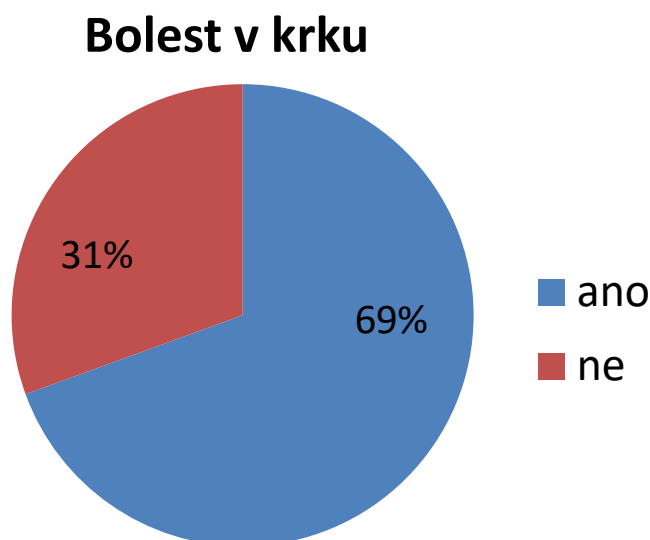
**Obr. 12:** *Graf s procentuálním zastoupením kuřáků*

Většina osob (85 %) byla nekuřáky, pouze 15 % lidí uvedlo, že je pravidelnými kuřáky. Mezi muži a ženami, kteří kouřili, nebyl významný procentuální rozdíl.



**Obr. 13:** Graf s procentuálním zastoupením rozmezí tělesných teplot

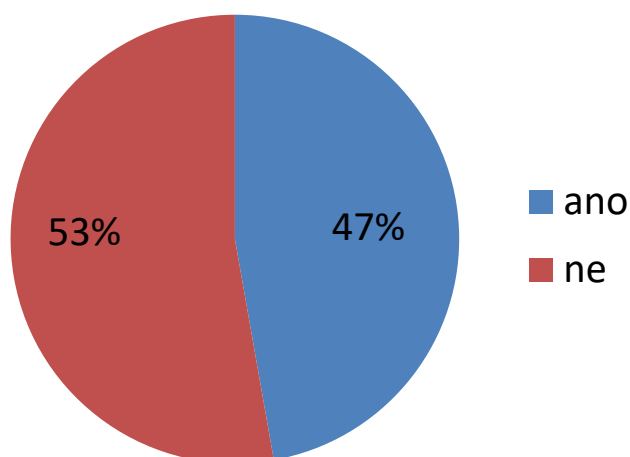
Největší část pacientů, která vyhledala lékaře, a dobrovolníků s respirační infekcí (45 %) měla normální tělesnou teplotu pod 37 °C. 30 % lidí mělo zvýšenou teplotu v rozmezí 37 až 37,9 °C. Horečku, tedy tělesnou teplotu vyšší než 38 °C mělo 25 % osob. Jeden pacient, který navštívil lékaře, měl tělesnou teplotu 40 °C.



**Obr. 14:** Graf ukazující procentuální zastoupení přítomnosti bolesti krku

Při první sadě sběru vzorků od lékařů nebyla otázka na bolest v krku v dotazníku zařazena. Výsledky zobrazené v koláčovém grafu jsou získané až z dotazníků od dobrovolníků. Jak lze na koláčovém grafu na obr. 14 vidět, více než polovina osob (69 %) uvedla, že je bolí nebo škrábe v krku.

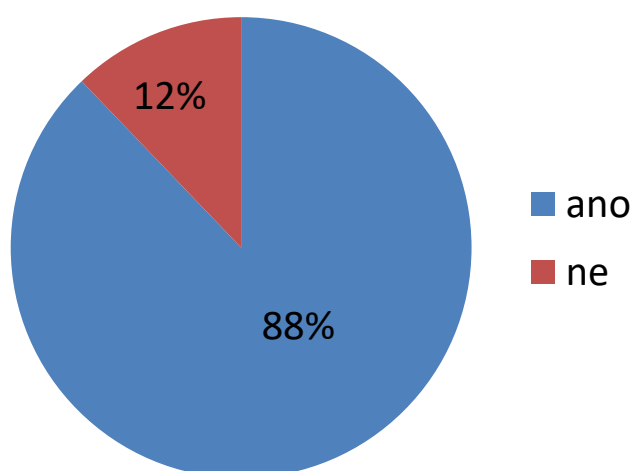
## Bolest na plicích



**Obr. 15:** Graf ukazující procentuální zastoupení přítomnosti bolesti na plicích

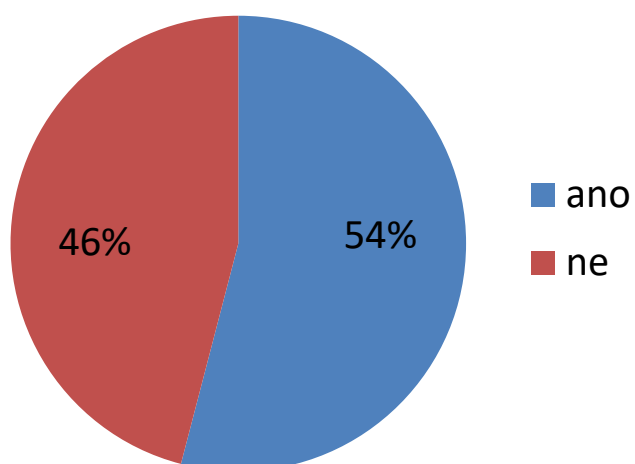
Stejně jako byla „bolest v krku“ zařazena do dotazníků až při sběru vzorků od dobrovolníků, tak i „bolest na plicích“ byla do dotazníku uváděna později. Obr. 15 znázorňuje koláčový graf s četností zastoupení odpovědí „ano“ a „ne“ na otázku, zda osobu bolí na plicích. Všichni, kteří odpověděli kladně na otázku, zda je bolí na plicích, měli zároveň i kašel.

## Kašel



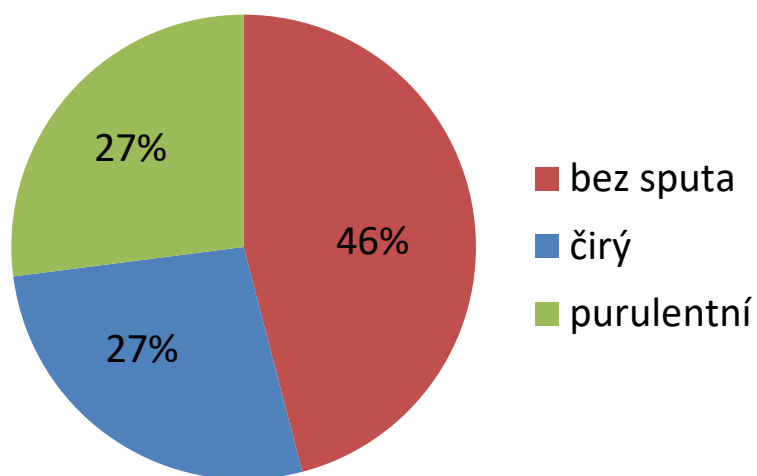
**Obr. 16:** Graf ukazující procentuální zastoupení přítomnosti kašle

## Vykašlávání sputa



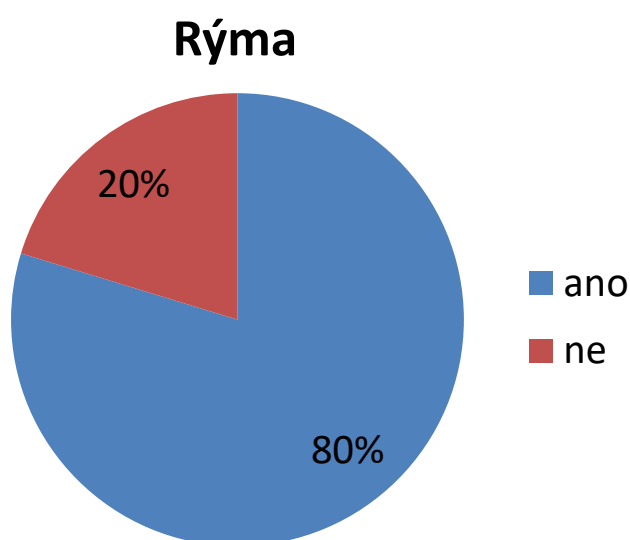
**Obr. 17:** Graf ukazující procentuální zastoupení přítomnosti sputa při kašli

## Charakter sputa

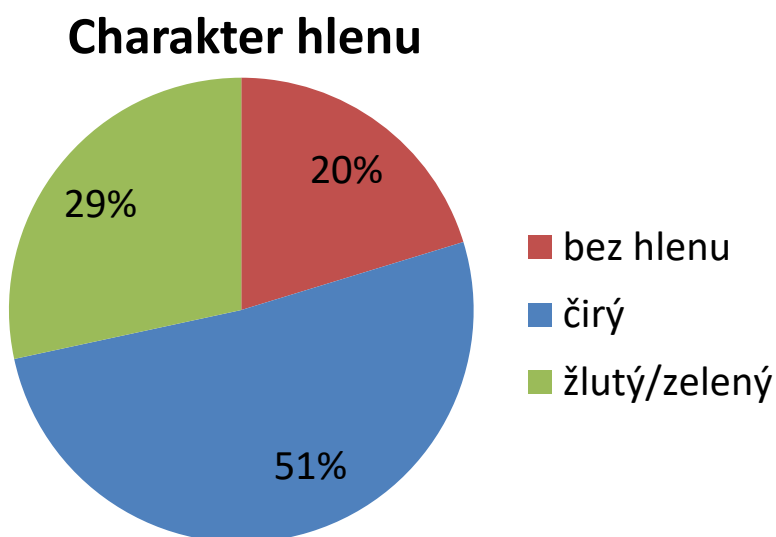


**Obr. 18:** Graf ukazující procentuální zastoupení charakteru sputa

Jak lze vidět na obr. 16, téměř každý devátý člověk z deseti trpěl kašlem. V 46 % případů (34 osob) dotazovaný uvedl suchý kašel a v 54 % (40 osob) kašel s vykašláváním sputa (obr. 17). Přesně polovina nemocných, která během kašle vykašlávala sputum, měla sputum čiré, a druhá polovina měla sputum zánětlivého charakteru, které mělo žlutou, popřípadě zelenou barvu (obr. 18).



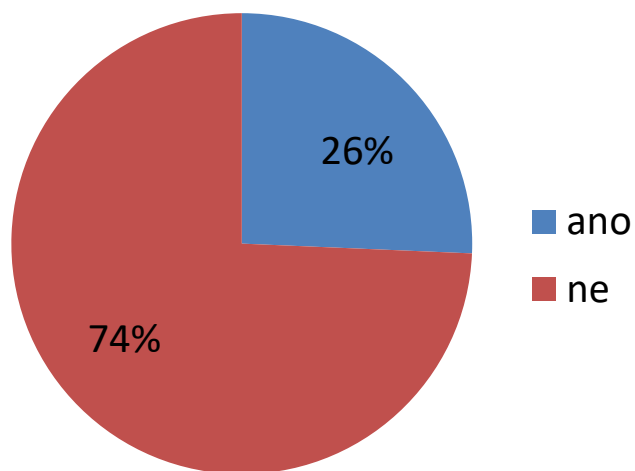
**Obr. 19:** Graf ukazující procentuální zastoupení rýmy



**Obr. 20:** Graf ukazující procentuální charakter hlenu při rýmě

Čtyři pětiny nemocných měly jako jeden z příznaků respirační infekce rýmu (obr. 19). Jak lze vidět na koláčovém grafu na obr. 20, více než polovina nemocných (64 % lidí s rýmou) vysmrkávala čirý nosní sekret a 36 % lidí vysmrkávalo zánětlivý žlutozelený sekret.

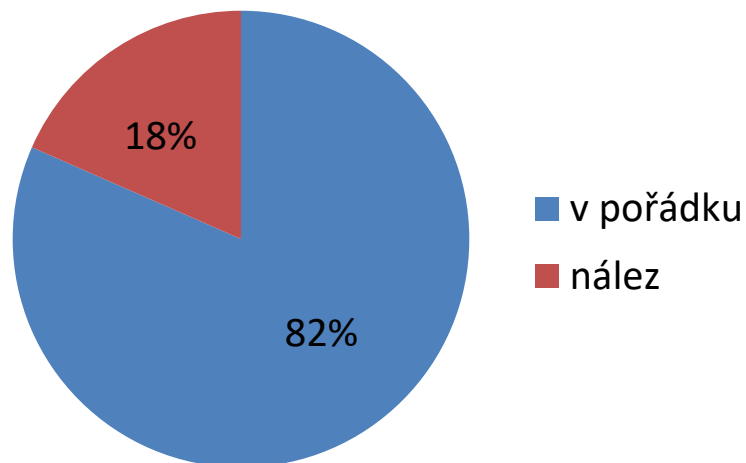
### Zvětšené krční uzliny



**Obr. 21:** Graf ukazující procentuální zastoupení zvětšení krčních uzlin

Čtvrtina nemocných s infekcí dýchacích cest měla během onemocnění zvětšenou jednu nebo více krčních uzlin.

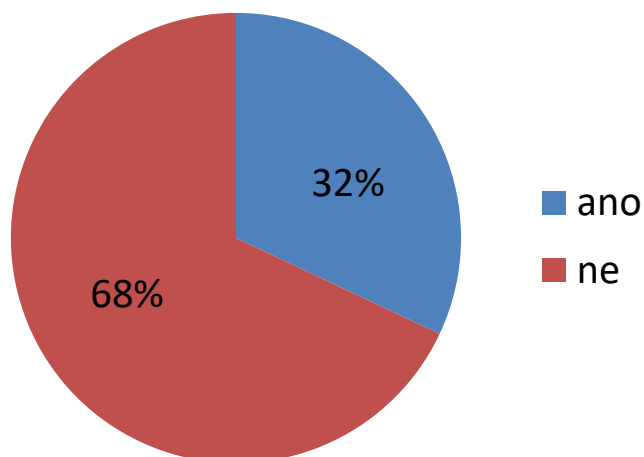
## Poslechový nález



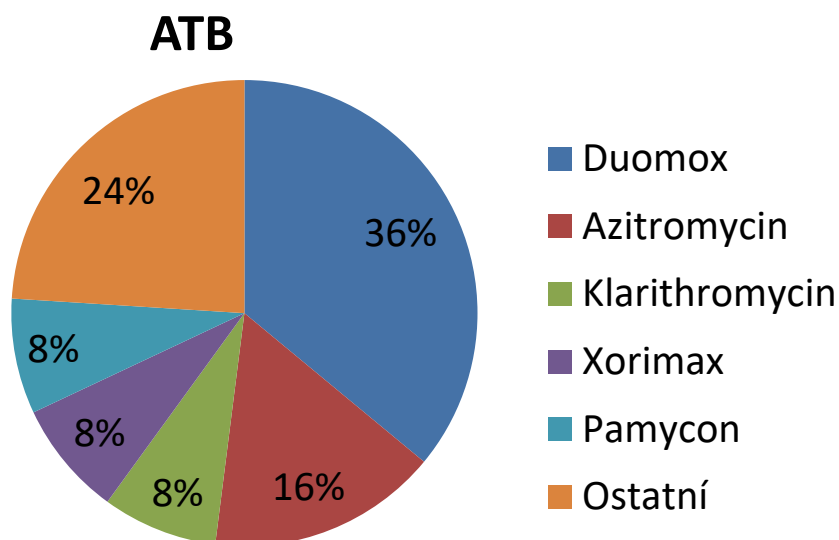
**Obr. 22:** Graf ukazující procentuální zastoupení poslechového nálezu

V prvním roce sběru, kdy vzorky sbírali praktičtí lékaři, byl do dotazníku zaznamenán i případný poslechový nález. U většiny pacientů (82%) byl poslech čistý.

## ATB terapie



**Obr. 23:** Graf ukazující procentuální zastoupení nasazení antibiotické terapie



**Obr. 24:** Graf ukazující procentuální zastoupení předepsaných antibiotik

Téměř třetině nemocných s infekcí dýchacích cest byla nasazena antibiotická léčba (obr. 23). Nejvíce předepisovaným lékem byl Duomox (amoxicillinum), který byl předepsán devíti pacientům. Čtyřem pacientům byl předepsán Azitromycin a dvakrát byla předepsána antibiotika Klarithromycin, Xorimax (cefuroxim) a Pamycon (neomycinium, bacitracinum). Čtvrtina předepisovaných ATB (viz obr. 24) byla předepsaná pouze jednou, patřila sem antibiotika Augmentin (amoxicillinum, acidum clavulanicum), Doxybene (doxycyclinum), Penbene (phenoxymethylpenicillinum), Zenaro (levocetirizinium), Zinnat (cefuroxim) a Klacid (klarithromycin), který byl předepsán celkem dvakrát, v druhém případě byl zvolen jako nové antibiotikum po předchozí neúčinné léčbě (Duomox). V dalším případě byl po zřejmě neúčinné léčbě lékem Duomox předepsán Fromilid (klarithromycin). V jednom případě nebylo v dotazníku uvedeno jméno léčivého přípravku, nemocný pouze uvedl, že se jednalo o „třídenní“ antibiotika.

V prvním roce odběru vzorků byla v dotazníku uvedena případná přítomnost čepů na mandlích, avšak pouze u jedné ženy lékař zaznamenal čepy, proto zde není patřičný graf s procentuálním zastoupením.

Při statistickém zpracování dotazníků nebyly nalezeny žádné zvláštní vztahy a korelace.

### 5.3.1 POZITIVNÍ VZORKY NA *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

Pozitivní vzorky na bakterii *Mycoplasma pneumoniae* patřily ženám. Obě ženy do dotazníku uvedly, že jejich současná tělesná teplota byla vyšší než 38,5 °C (respektive 38,6 °C a 39 °C), obě měly kašel a vykašlávaly čiré sputum (viz obr. 24). Další tabulka (obr. 25) shrnuje ostatní uvedené skutečnosti v dotazníku, které jsou však rozdílné,

Kód:	Pohlaví:	Tělesná teplota:	Kašel:	Vykašlávání sputa:	Charakter sputa:
RI17	žena	38,6 °C	ano	ano	čirý
RI124	žena	39 °C	ano	ano	čirý

**Obr. 25:** Společné příznaky u osob pozitivních na infekci způsobenou bakterií *Mycoplasma pneumoniae*

Kód:	Věk:	Kouření:	Bolest v krku:	Bolest na plicích:	Zvětšené krční uzliny:	Smrkání:	Charakter hlenu:	ATB terapie:
RI17	69	ano	neuveдено	neuveдено	ne	ne	-	ano
RI124	32	ne	ne	ano	ano	ano	žlutý/zelený	ne

**Obr. 26:** Odlišné příznaky u osob pozitivních na infekci způsobenou bakterií *Mycoplasma pneumoniae*

U první pacientky s mykoplazmovou infekcí byla nasazena antibiotická terapie a předepsán lék Duomox, jehož účinnou látkou je Amoxicillinum a patří tak mezi beta-laktamová antibiotika. Po týdnu však byla ATB terapie změněna a nově byl předepsán lék Klacid s účinnou látkou Clarithromycinum, který patří mezi makrolidová antibiotika. Amoxicilin se k léčbě mykoplazmových infekcí nepoužívá, protože mykoplazmata nemají téměř žádnou buněčnou stěnu, kterou by beta-laktamová antibiotika rozložila. Klarithromycin se k léčbě mykoplazmových infekcí používá. ATB léčba byla předepsána na základě empirických zkušeností, nikoliv na základě stanovené citlivosti ATB u daného pacienta [5, 18, 24, 56].

## 6 DISKUZE

### 6.1 ETIOLOGIE KOMUNITNÍCH PNEUMONIÍ

U více než poloviny případů komunitních pneumonií není identifikován původce infekce, jak uvádí chorvatská studie z roku 2012 [57].

V chorvatské studii z roku 2012, které se zúčastnilo 80 pacientů, byla bakterie *Legionella pneumophila* diagnostikována u 2 z 32 testovaných vzorků moče pacientů s komunitní pneumonií. U 64 vzorků sputa a 19 vzorků bronchoalveolární laváže byla metodou PCR pouze v jediném vzorku sputa detekována *Mycoplasma pneumoniae*. Ani v jednom z 19 vzorků BAL nebyla metodou PCR detekována *L. pneumophila*, *M. pneumoniae* ani *Chlamydophila pneumoniae*. Sérologickými metodami, konkrétně metodou ELISA, bylo vyšetřeno 79 vzorků séra. Protilátky IgM proti *L. pneumophila* nebyly identifikovány ani v jednom případě, u 2 vzorků byly zjištěny protilátky IgG, avšak nedošlo zde ke čtyřnásobnému vzestupu titru a proto vzorky nebyly označeny jako pozitivní. V 6 případech byly detekovány IgA a IgM protilátky proti *M. pneumoniae* a 4 případy IgM protilátek proti *C. pneumoniae* (protilátky IgG byly u obou bakterií negativní) [57].

Francouzská studie, která probíhala od března 2007 do dubna 2010, uvádí, že u 254 dospělých pacientů s pneumonií byl původce zjištěný pouze u 86 pacientů (33,9 %). U 24 případů (9,4 %) pneumonie byla za původce označena *Legionella pneumophila*, u 18 pacientů *Mycoplasma pneumoniae* (7,1 %) a 17 *Streptococcus pneumoniae*, zbylí prokázání původci pneumonie nejsou ve studii zmíněni [58].

V japonské studii, probíhající od září 2011 do ledna 2013, bylo metodou PCR vyšetřeno 718 vzorků sputa od pacientů s pneumonií. *L. pneumophilla* nebyla původcem pneumonie u žádného pacienta. *M. pneumoniae* byla označena za původce u 38 (5,3 %) pacientů a *C. pneumoniae* u 6 (0,8 %) pacientů [59].

Uvádí se, že *Legionella pneumophila* je původcem přibližně v 10 % případů všech pneumonií a u komunitních pneumonií je to 2 – 5 % [58, 60, 61]. V České republice mezi lety 2000 až 2011 převažovaly v 73 % komunitní legionelové infekce, menší část

tak tvořily legionelózy cestovní, související s poskytnutou zdravotní péčí a profesní nákazy. Průměrně bylo ročně hlášeno okolo 12 legionelových nákaz, teprve od roku 2009, kdy byla zavedena surveillance, stoupl počet hlášených nákaz na 33 (Národní referenční laboratoř - NRL). V roce 2010 opět počet vzrostl, a to na 43 (EPIDAT) hlášených případů legionelóz a o rok později tedy v roce 2011 bylo hlášeno 60 (NRL) pacientů s infekcí způsobenou *L. pneumophila*. V roce 2012 počet hlášených případů klesl na 46 (EPIDAT) [62]. Dle statistik však počet onemocnění způsobených legionelou u nás stále stoupá, jen v roce 2017 bylo za prvních 10 měsíců hlášeno již 159 případů legionelové infekce [63].

Prevalence komunitních pneumonií způsobených *Mycoplasma pneumoniae* je 10 - 50 %. Například v sousedním Německu byla v roce 2012 mykoplazma původcem 12,3 % komunitních pneumonií. V naší studii byly pozitivní vzorky pouze 2 z 92 testovaných vzorků, což je 2%. Vhodné by bylo vzorek testovat více metodami, aby se výsledek potvrdil nebo vyvrátil. Pořád je zde možnost falešně negativního výsledku. Nevýhodou je i poměrně nízký počet vyšetřených vzorků, některé zahraniční studie pracovaly s menším počtem vzorků než naše studie, avšak některé studie získávaly data až od tisíců pacientů [60, 64, 65].

*Chlamydia pneumoniae* způsobuje 1 až 20 % případů získaných komunitních pneumonií [60, 65, 66].

Vyšší prevalenci pneumonií způsobených *L. pneumophila*, *M. pneumoniae* a *C. pneumoniae* uváděly studie, které se mimo jiné zaměřovaly právě na tyto původce.

## **6.2 LÉČBA INFEKČÍ ZPŮSOBENÝCH *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*, *MYCOPLASMA PNEUMONIAE* A *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE***

Infekce dýchacích cest způsobené způsobených *L. pneumophila*, *M. pneumoniae* a *C. pneumoniae* se běžně léčí antibiotiky, k léčbě se používají makrolidy, tetracykliny a chinolony. Objevují se však názory, že infekce s lehčím průběhem by se měly léčit pouze symptomaticky [21]. Rezistence na antibiotika u těchto bakterií bývají poměrně vzácná, výjimkou je citlivost na makrolidy u *M. pneumoniae*, kde je rezistence velkým problémem především v asijských státech.

Je více než vhodné začít testovat citlivost *L. pneumophila*, aby bylo případně možné vyhodnotit riziko rezistence na daná antibiotika [67]. Až donedávna nebyla u žádného pacienta léčeného fluorochinolony nalezena rezistence. Nyní se má za to, že rezistence je způsobena mutací genu *gyrA* [68]. Makrolidy jsou lékem první volby při léčbě legionelových infekcí, jsou předepisovány i bez předchozího stanovení citlivosti. Dosud nebyly izolovány žádné rezistentní kmeny, avšak byly popsány případy, kdy došlo k úmrtí pacienta i přes včasnou léčbu a vyzvaly tak myšlenky, zda nemůže docházet k rezistenci stejně jako u fluorochinolonů, proto se současné studie zaměřují na identifikaci mutací [69–71].

V současné době je největším problémem v léčbě infekcí způsobených *M. pneumoniae* nárůst rezistence vůči makrolidovým antibiotikům. Byla detekována mutace v poici 23S rRNA. V USA bylo v roce 2014 rezistentních až 13 % vzorků, u kterých se stanovovala citlivost. V Číně bylo dokonce v jedné studii zaznamenáno 100 % necitlivých vzorků vůči makrolidové léčbě a v Japonsku se rezistence vůči makrolidům pohybuje kolem 90 %. V Evropě se pohybuje rezistence *M. pneumoniae* na léčbu makrolidy pod 10 %, avšak studie prováděná v Itálii v roce 2010 uvádí až 26% rezistenci [19, 25, 65, 72, 73]. Rezistence vůči tetracyklinům a chinolonům jsou poměrně vzácné, zkoumá se však vliv mutace v 16S rRNA, které mohou snižovat citlivost na tetracyklinová antibiotika [74].

### **6.3 SROVNÁNÍ CEN VYŠETŘENÍ A CITLIVOSTI METOD VZHLEDEM K EKONOMICE LÉČBY**

Nespornou roli v diagnostice a léčbě infekcí hrají náklady na vyšetření. Bohužel ne vždy jsou testy s největší citlivostí pro danou laboratoř cenově dostupné. Cenu vyšetření může určovat i objem vyšetřených vzorků.

Cena kultivace *Legionella pneumophila* se pohybuje v rozmezí 420 - 800 Kč a citlivost metody je zhruba 80 % (specifická je téměř 100 %). Výhodou metody je detekce všech druhů legionel a případné provedení citlivosti na ATB z vyrostlé kultury [15, 75–77]. Vyšetření legionelového antigenu v moči stojí zhruba 500 - 650 Kč a citlivost metody se pohybuje od 70 až do 100 % (specifická je též kolem 100 %). Nespornou výhodou detekce legionelového antigenu v moči je rychlost stanovení a navíc

vyšetření není ovlivněné léčbou [12, 15, 16, 75, 78–83]. Průměrná cena vyšetření protilátek proti *L. pneumophila* metodou ELISA je od 500 do 1500 Kč, citlivost metody závisí i na typu vyšetřované protilátky, obecně je to 70 – 100% (specifická >95 %) [84–86]. Vyšší cena je však za vyšetření nukleových kyselin *Legionella pneumophila* metodou PCR, v průměru 1200 Kč [87]. Citlivost metody se uvádí od 17 do 100 % (specifická >95 %), nízká senzitivita však figurovala především ve starších studiích, proto se lze domnívat, že s novými metodami a většími znalostmi s navrhováním specifických primerů se citlivost metody zvyšuje. Mimo jiné citlivost PCR závisí na typu vzorku. Krev a moč vykazovala daleko menší citlivost metody PCR než vzorky sputa a výtěry z krku [16, 88]. Zdá se, že detekce močového antigenu a PCR jsou vhodné metody detekce patogenu na začátku infekce, na rozdíl od serologických metod, kde se musí porovnat vzestup titru mezi 2 vzorky s odstupem několika dní [58, 88].

Průkaz IgM, IgG nebo IgA protilátek proti *Mycoplasma pneumoniae* metodou ELISA, která má obvykle citlivost 94 % a větší (specifická bývá kolem 97 % a vyšší) stojí cca 50 – 1200 Kč [75, 78, 89–91]. Průkaz protilátek KFR je cca 240 Kč, uvádí se, že citlivost bývá daleko nižší než stanovení protilátek metodou ELISA [75, 92]. Protilátky proti *M. pneumoniae* lze zjistit imunofluorescenční metodou, jejíž citlivost je poměrně vysoká, pohybuje se od 80 % až k 100 % (specifická bývá větší než 95 %), přibližnou cenu vyšetření se mi však nepovedlo dohledat, tato metoda nemá takovou oblibu jako ELISA nebo KFR [93–95]. Orientační cena stanovení DNA *Mycoplasma pneumoniae* metodou Real-Time PCR je okolo, citlivost metody je téměř 100% (specifická bývá okolo 95 %) 1400 Kč [75, 87, 96].

U bakterie *Chlamydomphila pneumoniae* lze prokázat protilátky třídy IgM, IgG a IgA metodou ELISA. Citlivost metody se liší podle třídy protilátek, avšak průměrně bývá alespoň 90%, některé kity dosahují až 100% senzitivity (specifická bývá téměř 100 %) a cena je přibližně 590 - 1500Kč za stanovení jedné třídy protilátek [75, 76, 78, 97–100]. Protilátky proti *Chlamydomphila pneumoniae* lze v biologickém vzorku prokázat i pomocí imunofluorescence, jejíž cena je 400 Kč a citlivost se pohybuje kolem 80 % (specifická větší než 90 %) [75, 93]. Nejdražším typem vyšetření *Chlamydomphila pneumoniae* se zdá být průkaz protilátek IgM, IgG a IgA metodou westernblott, která stojí 960 - 2500 Kč. Metoda má velkou citlivost, která se pohybuje kolem 95 % (specifická bývá taktéž kolem

95 %) [75, 97, 101]. Vyšetření nukleových kyselin metodou PCR se opět jako u předchozích bakterií stojí v průměru kolem 1200 Kč, citlivost některých PCR kitů dosahuje 100% (specifita také, někdy však menší kolem 85 %), avšak v literatuře staršího bývá uvedená senzitivita daleko menší i kolem 60 % [30, 75, 87, 102, 103].

Shrnu-li největší výhody a nevýhody jednotlivých metod detekce bakterií *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* a *Chlamydia pneumoniae*, tak kultivace má nízkou citlivost a případné narostlé kolonie lze otestovat na citlivost vůči antibiotikům. V dnešní době se od kultivace těchto bakterií ustupuje, neboť je kultivace časově náročná. Velmi oblíbenou metodu v diagnostice legionelové infekce je průkaz antigenu v moči, metoda je poměrně citlivá a výsledek je znám do několika hodin. Na vzestupu jsou molekulární metody detekce, jako je PCR, které jsou vhodné pro detekci časně fáze infekce a tím pádem lze pacientovi nasadit příslušnou antibiotickou léčbu. Citlivost PCR metod je v dnešní době vysoká, námi použité diagnostické kity dosahovaly 100% citlivosti i specifity. Pro PCR je vhodné odebrat vzorek v akutní fázi nemoci. Nevýhodou je však poměrně vysoká cena vyšetření, která bývá i téměř trojnásobně vyšší než u serologických metod. Serologické metody jsou velmi oblíbené, avšak vzhledem k opožděné tvorbě protilátek se nehodí k počáteční diagnostice metody. Serologické metody jsou užitečné pro sledování dynamiky a tvorby protilátek (je vhodné odebrat dva vzorky, druhý obvykle po 2 až 3 týdnech po prvním odběru), případně potvrzení správné antibiotické léčby a potvrzení správného výsledku přímých metod průkazu patogenu. Obvykle se rutinně využívá dvou metod k potvrzení diagnózy.

## 7 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zpracování vzorků od pacientů praktických lékařů, kteří vykazovali známky infekce dýchacích cest, a následně sbírat a zpracovat vzorky od dobrovolníků s respirační infekcí, kteří se zapojili do naší studie, a zjistit tak výskyt respiračních infekcí způsobených bakteriemi *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* a *Chlamydophila pneumoniae*. Z diskuze je patrné, že výskyt pneumonií způsobený těmito bakteriemi se poměrně v různých studiích liší. Stejně tak se však lišil i počet zpracovaných vzorků, kde někdy to byly pouhé desítky a jindy tisíce a tam byl výskyt procentuálně vyšší. Výskyt komunitních pneumonií způsobených *L. pneumophila*, *M. pneumoniae* a *C. pneumoniae* se zvyšuje, avšak nárůst případů může být mimo jiné způsobený lepší diagnostikou těchto původců než v minulosti.

V léčbě těchto bakterií jsou lékem první volby makrolidy. Současným problémem je zvyšující se rezistence vůči makrolidům u *M. pneumoniae*. Dnešní studie se zaměřují na identifikaci mutací, které by mohly ovlivnit citlivost *L. pneumophila*, *M. pneumoniae* a *C. pneumoniae* k antibiotikům.

Součástí práce bylo zpracování dotazníků, které byly vyplněny vždy před samotným odběrem vzorku.

Jako metodu detekce *L. pneumophila*, *M. pneumoniae* a *C. pneumoniae* jsme použily Real-Time PCR, která má velkou citlivost, výsledek vyšetření je znám během několika hodin a hodí se tedy pro časnou diagnostiku infekce, nevýhodou je však finanční stránka vyšetření.

## 8 CITOVANÁ LITERATURA

- [1] JABLONICKÝ, MUDr Pavol. Pohled na problematiku zánětů horních cest dýchacích. *Interní medicína pro praktické lékaře* [online]. 2004, 3. Dostupné z: <https://solen.cz/pdfs/med/2004/01/10.pdf>
- [2] VOTAVA, Miroslav, MASARYKOVA UNIVERZITA a LÉKAŘSKÁ FAKULTA. *Klinická mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2014. ISBN 978-80-210-7503-0.
- [3] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2005. ISBN 978-80-86850-00-9.
- [4] AMBROŽOVÁ, Helena a A KOLEKTIV. *Diferenciálně diagnostické kapitoly z infekčního lékařství*. Praha: Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2040-4.
- [5] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8.
- [6] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 978-80-902896-6-6.
- [7] OLIVA, Giulia, Tobias SAHR a Carmen BUCHRIESER. The Life Cycle of *L. pneumophila*: Cellular Differentiation Is Linked to Virulence and Metabolism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2018, **8** [vid. 2018-05-08]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2018.00003
- [8] RATHORE, Mobeen H. Legionella Infection: Background, Pathophysiology, Epidemiology. *Medscape* [online]. 2017 [vid. 2018-04-24]. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/965492-overview>
- [9] PEUTHERER, John F, David GREENWOOD a Richard C. B SLACK. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada, 1999. ISBN 978-80-7169-365-9.
- [10] GOERING, Richard V, Hazel M DOCKRELL, Mark A ZUCKERMAN, Ivan M ROITT, Peter L CHIODINI, Jaroslav JULÁK, Jan BOBEK, Renáta ČERMÁKOVÁ, Karel HOLADA, Zora MĚLKOVÁ, Tibor MOŠKO, Jan NOVÁK, Ludmila PROKEŠOVÁ a Jiřina SUCHANOVÁ. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. Praha: Triton, 2016. ISBN 978-80-7387-928-0.
- [11] BEDNÁŘ, Marek, Věra FRAŇKOVÁ, Jiří SCHINDLER, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996. ISBN 978-80-238-0297-9.
- [12] SHARMA, Lokesh, Ashley LOSIER, Thomas TOLBERT, Charles S. DELA CRUZ a Chad R. MARION. Pneumonia Updates on Legionella, Chlamydophila, and Mycoplasma Pneumonia. *Clinics in chest medicine* [online]. 2017, **38**(1), 45–58 [vid. 2018-05-04]. ISSN 0272-5231. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccm.2016.11.011

- [13] GOSSMAN, William G. a Vidya SUNDARESHAN. Legionnaires' Disease (Legionella Infection). In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2018 [vid. 2018-05-08]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430807/>
- [14] DIAS, A., A. CYSNEIROS, F. T. LOPES, B. VON AMANN, C. COSTA, P. DIONÍSIO, J. CARVALHO, V. DURÃO, G. CARVALHO, F. PAULA, M. SERRADO, B. NUNES, T. MARQUES, F. FROES a C. BÁRBARA. The typical presentation of an atypical pathogen during an outbreak of Legionnaires' disease in Vila Franca de Xira, Portugal, 2014. *Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)* [online]. 2017, **23**(3), 117–123 [vid. 2018-05-08]. ISSN 2173-5115. Dostupné z: [doi:10.1016/j.rppnen.2017.01.007](https://doi.org/10.1016/j.rppnen.2017.01.007)
- [15] PIERRE, David M., Julianne BARON, Victor L. YU a Janet E. STOUT. Diagnostic testing for Legionnaires' disease. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* [online]. 2017, **16** [vid. 2018-04-27]. ISSN 1476-0711. Dostupné z: [doi:10.1186/s12941-017-0229-6](https://doi.org/10.1186/s12941-017-0229-6)
- [16] AVNI, Tomer, Amir BIEBER, Hefziba GREEN, Tali STEINMETZ, Leonard LEIBOVICI a Mical PAUL. Diagnostic Accuracy of PCR Alone and Compared to Urinary Antigen Testing for Detection of Legionella spp.: a Systematic Review. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2016, **54**(2), 401–411 [vid. 2018-05-04]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: [doi:10.1128/JCM.02675-15](https://doi.org/10.1128/JCM.02675-15)
- [17] CRISTOVAM, Elisabete, Dejanira ALMEIDA, Daniel CALDEIRA, Joaquim J. FERREIRA a Teresa MARQUES. Accuracy of diagnostic tests for Legionnaires' disease: a systematic review. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2017. Dostupné z: [http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmm/66/4/485\\_jmm000454.pdf?expires=1524814035&id=id&accname=sgid024228&checksum=FFE2C386309FC0AC1882B0A11AD1129](http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmm/66/4/485_jmm000454.pdf?expires=1524814035&id=id&accname=sgid024228&checksum=FFE2C386309FC0AC1882B0A11AD1129)
- [18] KASHYAP, Surender a Malay SARKAR. Mycoplasma pneumonia: Clinical features and management. *Lung India : Official Organ of Indian Chest Society* [online]. 2010, **27**(2), 75–85 [vid. 2018-05-02]. ISSN 0970-2113. Dostupné z: [doi:10.4103/0970-2113.63611](https://doi.org/10.4103/0970-2113.63611)
- [19] PEREYRE, Sabine, Julien GORET a Cécile BÉBÉAR. Mycoplasma pneumoniae: Current Knowledge on Macrolide Resistance and Treatment. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, **7** [vid. 2018-05-05]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: [doi:10.3389/fmicb.2016.00974](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00974)
- [20] PARROTT, Gretchen L., Takeshi KINJO a Jiro FUJITA. A Compendium for Mycoplasma pneumoniae. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, **7** [vid. 2018-05-08]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: [doi:10.3389/fmicb.2016.00513](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00513)
- [21] KARIMOVA, Zarina, Zuzana PETRŮJOVÁ a Hana ROHÁČOVÁ. Chlamydia pneumoniae a Mycoplasma pneumoniae v etiologii respiračních infekcí – včasná diagnostika a adekvátní léčba. *Medical Tribune CZ* [online]. 2016 [vid. 2018-05-05]. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/clanek/38849-chlamydia-pneumoniae->

a-mycoplasma-pneumoniae-v-etilogii-respiracnich-infekci-vcasna-diagnostika-a-adekvatni-lecba

- [22] DASH, Saroj, Rama CHAUDHRY, Benu DHAWAN, Aparajit Ballav DEY, Sushil Kumar KABRA a Bimal Kumar DAS. Clinical spectrum and diagnostic yields of Mycoplasma pneumoniae as a causative agent of community-acquired pneumonia. *Journal of Laboratory Physicians* [online]. 2018, **10**(1), 44–49 [vid. 2018-05-08]. ISSN 0974-2727. Dostupné z: doi:10.4103/JLP.JLP\_62\_17
- [23] SARAYA, Takeshi. Mycoplasma pneumoniae infection: Basics. *Journal of General and Family Medicine* [online]. 2017, **18**(3), 118–125 [vid. 2018-05-08]. ISSN 2189-6577. Dostupné z: doi:10.1002/jgf2.15
- [24] BONO, Michael Joseph. Mycoplasmal Pneumonia Medication. *Medscape* [online]. 2017. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/1941994-medication>
- [25] YAMAZAKI, Tsutomu a Tsuyoshi KENRI. Epidemiology of Mycoplasma pneumoniae Infections in Japan and Therapeutic Strategies for Macrolide-Resistant M. pneumoniae. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, **7** [vid. 2018-05-05]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.00693
- [26] LOENS, K., D. URSI, H. GOOSSENS a M. IEVEN. Molecular Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae Respiratory Tract Infections. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2003, **41**(11), 4915–4923 [vid. 2018-05-03]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.41.11.4915-4923.2003
- [27] HUSTON, Wilhelmina M., Christopher J. BARKER, Anu CHACKO a Peter TIMMS. Evolution to a Chronic Disease Niche Correlates with Increased Sensitivity to Tryptophan Availability for the Obligate Intracellular Bacterium Chlamydia pneumoniae. *Journal of Bacteriology* [online]. 2014, **196**(11), 1915–1924 [vid. 2018-05-08]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.01476-14
- [28] Chlamydia pneumoniae infection. *Centers for Disease Control and Prevention* [online]. 2016 [vid. 2018-04-24]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/cpneumoniae/index.html>
- [29] CHOROSZY-KROL, I, IM FREJ-MADRZAK, D TERYKS-WOLYNIEC, A JAMA-KMIECIK, G GOSCINIAK, I PIROGOWICZ a M POKORSKI. Respiratory infection caused by chlamydophila pneumoniae in children and adolescents in the lower silesia region of poland. *European Journal of Medical Research* [online]. 2010, **15**(Suppl 2), 112–114 [vid. 2018-05-08]. ISSN 0949-2321. Dostupné z: doi:10.1186/2047-783X-15-S2-112
- [30] HVIDSTEN, D., D. S. HALVORSEN, B. P. BERDAL a T. J. GUTTEBERG. Chlamydophila pneumoniae diagnostics: importance of methodology in relation to timing of sampling. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2009, **15**(1), 42–49 [vid. 2018-05-03]. ISSN 1198-743X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02075.x
- [31] PEELING, Rosanna W. Laboratory diagnosis of Chlamydia pneumoniae infections. *The Canadian Journal of Infectious Diseases* [online]. 1995, **6**(4), 198–203

[vid. 2018-05-08].

ISSN 1180-2332.

Dostupné

z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3327923/>

- [32] BENEŠ, Jiří. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, 2009. ISBN 978-80-7262-644-1.
- [33] RAJČÁNI, Július a Fedor ČIAMPOR. *Lekárska virológia*. Bratislava: Veda, 2007. ISBN 978-80-224-0911-7.
- [34] BERAN, Jiří. *Chřipka: klinický obraz, prevence a léčba*. Praha: Maxdorf, 2005. ISBN 978-80-7345-073-1.
- [35] SAUTTO, Giuseppe A., Greg A. KIRCHENBAUM a Ted M. ROSS. Towards a universal influenza vaccine: different approaches for one goal. *Virology Journal* [online]. 2018, **15** [vid. 2018-05-09]. ISSN 1743-422X. Dostupné z: doi:10.1186/s12985-017-0918-y
- [36] SHIM, Jung Min, Jinhee KIM, Tanel TENSON, Ji-Young MIN a Denis E. KAINOV. Influenza Virus Infection, Interferon Response, Viral Counter-Response, and Apoptosis. *Viruses* [online]. 2017, **9**(8) [vid. 2018-05-09]. ISSN 1999-4915. Dostupné z: doi:10.3390/v9080223
- [37] KIM, Dae-Ki a Barun POUDEL. Tools to Detect Influenza Virus. *Yonsei Medical Journal* [online]. 2013, **54**(3), 560–566 [vid. 2018-05-09]. ISSN 0513-5796. Dostupné z: doi:10.3349/ymj.2013.54.3.560
- [38] FALSEY, Ann R. a Edward E. WALSH. Respiratory Syncytial Virus Infection in Adults. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2000, **13**(3), 371–384 [vid. 2018-05-08]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88938/>
- [39] COLOSIA, Ann D., Jin YANG, Eric HILLSON, Josephine MAUSKOPF, Catherine COPLEY-MERRIMAN, Vivek SHINDE a Jeffrey STODDARD. The epidemiology of medically attended respiratory syncytial virus in older adults in the United States: A systematic review. *PLoS ONE* [online]. 2017, **12**(8) [vid. 2018-05-08]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0182321
- [40] ZHANG, Su-fen, Jiu-ling TUO, Xu-bin HUANG, Xun ZHU, Ding-mei ZHANG, Kai ZHOU, Lei YUAN, Hong-jiao LUO, Bo-jian ZHENG, Kwok-yung YUEN, Meng-feng LI, Kai-yuan CAO a Lin XU. Epidemiology characteristics of human coronaviruses in patients with respiratory infection symptoms and phylogenetic analysis of HCoV-OC43 during 2010-2015 in Guangzhou. *PLoS ONE* [online]. 2018, **13**(1) [vid. 2018-05-08]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0191789
- [41] GRIFFITHS, Cameron, Steven J. DREWS a David J. MARCHANT. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2017, **30**(1), 277–319 [vid. 2018-05-08]. ISSN 0893-8512, 1098-6618. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00010-16
- [42] CÉSPEDES, Pablo F., Christian E. PALAVECINO, Alexis M. KALERGIS a Susan M. BUENO. Modulation of Host Immunity by the Human Metapneumovirus. *Clinical*

- Microbiology Reviews* [online]. 2016, **29**(4), 795–818 [vid. 2018-05-08]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00081-15
- [43] HAYNES, Amber K., Ashley L. FOWLKES, Eileen SCHNEIDER, Jeffrey D. MUTUC, Gregory L. ARMSTRONG a Susan I. GERBER. Human Metapneumovirus Circulation in the United States, 2008 to 2014. *Pediatrics* [online]. 2016, **137**(5), e20152927 [vid. 2018-05-08]. ISSN 0031-4005, 1098-4275. Dostupné z: doi:10.1542/peds.2015-2927
- [44] BINDER, Alison M., Holly M. BIGGS, Amber K. HAYNES, Christina CHOMMANARD, Xiaoyan LU, Dean D. ERDMAN, John T. WATSON a Susan I. GERBER. Human Adenovirus Surveillance — United States, 2003–2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* [online]. 2017, **66**(39), 1039–1042 [vid. 2018-05-08]. ISSN 0149-2195. Dostupné z: doi:10.15585/mmwr.mm6639a2
- [45] PAULINI, Inarei, Joselma SIQUEIRA-SILVA, Luciana THOMAZ, Leticia ROCHA, Charlotte HARSI, Nancy BELLEI a Celso GRANATO. Development of a prototype immunochromatographic test for rapid diagnosis of respiratory adenovirus infection. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* [online]. 2017, **21**(5), 500–506 [vid. 2018-05-08]. ISSN 1413-8670. Dostupné z: doi:10.1016/j.bjid.2017.03.023
- [46] PAN, Yang, Yi ZHANG, Weixian SHI, Xiaomin PENG, Shujuan CUI, Daitao ZHANG, Guilan LU, Yimeng LIU, Shuangsheng WU, Peng YANG a Quanyi WANG. Human parainfluenza virus infection in severe acute respiratory infection cases in Beijing, 2014-2016: A molecular epidemiological study. *Influenza and Other Respiratory Viruses* [online]. 2017, **11**(6), 564–568 [vid. 2018-05-08]. ISSN 1750-2640. Dostupné z: doi:10.1111/irv.12514
- [47] RIJN, Anneloes L. Van, Eric C. CLAAS, Peter A. von dem BORNE, Aloys C. M. KROES a Jutte J. C. de VRIES. Rhinovirus viremia in adult patients with high viral load in bronchoalveolar lavages. *Journal of Clinical Virology* [online]. 2017, **96**, 105–109 [vid. 2018-05-08]. ISSN 1386-6532, 1873-5967. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcv.2017.10.007
- [48] NEBESÁŘOVÁ, Jana. *Elektronová mikroskopie pro biology* [online]. 2001. Dostupné z: <http://triton.paru.cas.cz/old-lem/book/index.html>
- [49] KUBÍNEK, Roman, Klára ŠAFÁŘOVÁ a Milan VŮJTEK. *Elektronová mikroskopie* [online]. 2011. Dostupné z: <https://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/granty/elmikro.pdf>
- [50] VOTAVA, Miroslav. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. Brno: Hortus, 2000. ISBN 80-238-5058-X.
- [51] NUSSBAUM, Robert L, Roderick R MCINNES, Huntington F WILLARD a Petr GOETZ. *Klinická genetika*. Praha: Triton, 2004. ISBN 978-80-7254-475-2.
- [52] Polymerase chain reaction (PCR). *Khan Academy* [online]. [vid. 2018-04-24]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna->

technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr

- [53] DASTYCH, Milan, MASARYKOVA UNIVERZITA a LÉKAŘSKÁ FAKULTA. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant*. Brno: Masarykova univerzita, 2014. ISBN 978-80-210-7103-2.
- [54] NETLIBRARY, Inc a M. Tefvik DORAK. *Real-time PCR* [online]. New York; Abingdon [England: Taylor & Francis, 2006 [vid. 2018-04-24]. ISBN 978-0-203-96731-7. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=184225>
- [55] VALONES, Marcela Agne Alves, Rafael Lima GUIMARÃES, Lucas André Cavalcanti BRANDÃO, Paulo Roberto Eleutério DE SOUZA, Alessandra DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO a Sergio CROVELA. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. 2009, **40**(1), 1–11 [vid. 2018-05-09]. ISSN 1517-8382. Dostupné z: doi:10.1590/S1517-83822009000100001
- [56] NIEDERMAN, Michael S., Lionel A. MANDELL, Antonio ANZUETO, John B. BASS, William A. BROUGHTON, G. Douglas CAMPBELL, Nathan DEAN, Thomas FILE, Michael J. FINE, Peter A. GROSS, Fernando MARTINEZ, Thomas J. MARRIE, Joseph F. PLOUFFE, Julio RAMIREZ, George A. SAROSI, Antonio TORRES, Robert WILSON a Victor L. YU. Guidelines for the Management of Adults with Community-acquired Pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. 2001, **163**(7), 1730–1754 [vid. 2018-05-02]. ISSN 1073-449X. Dostupné z: doi:10.1164/ajrccm.163.7.at1010
- [57] MAREKOVIĆ, Ivana, Vanda PLEČKO, Zagorka BORAS, Ladislav PAVLOVIĆ, Ana BUDIMIR, Zrinka BOŠNJAK, Hrvoje PURETIĆ, Lidija ŽELE-STARČEVIĆ a Smilja KALENIĆ. Value of Rapid Aetiological Diagnosis in Optimization of Antimicrobial Treatment in Bacterial Community Acquired Pneumonia. *ZNAČENJE BRZE ETIOLOŠKE DIJAGNOZE U OPTIMIZACIJI ANTIMIKROBNOG LIJEČENJA BOLESNIKA S IZVANBOLNIČKOM PNEUMONIJOM UZROKOVANOM BAKTERIJAMA*. [online]. 2012, **36**(2), 401–408 [vid. 2018-05-03]. ISSN 03506134. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=sih&AN=78364880&lang=cs>
- [58] BOTELHO-NEVERS, Elisabeth, Florence GRATTARD, Alain VIALON, Séverine ALLEGRA, Sophie JARRAUD, Paul VERHOEVEN, Adrien MARCUCCILLI, Frédéric LUCHT, Bruno POZZETTO a Philippe BERTHELOT. Prospective evaluation of RT-PCR on sputum versus culture, urinary antigens and serology for Legionnaire's disease diagnosis. *Journal of Infection* [online]. 2016, **73**(2), 123–128 [vid. 2018-05-04]. ISSN 0163-4453. Dostupné z: doi:10.1016/j.jinf.2016.04.039
- [59] MORIMOTO, Konosuke, Motoi SUZUKI, Tomoko ISHIFUJI, Makito YAEGASHI, Norichika ASOH, Naohisa HAMASHIGE, Masahiko ABE, Masahiro AOSHIMA a Koya ARIYOSHI. The Burden and Etiology of Community-Onset Pneumonia in the Aging Japanese Population: A Multicenter Prospective Study. *PLoS ONE* [online]. 2015,

- 10(3)** [vid. 2018-05-04]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0122247
- [60] MARCHELLO, Christian, Ariella Perry DALE, Thuy Nhu THAI, Duk Soo HAN a Mark H. EBELL. Prevalence of Atypical Pathogens in Patients With Cough and Community-Acquired Pneumonia: A Meta-Analysis. *Annals of Family Medicine* [online]. 2016, **14(6)**, 552–566 [vid. 2018-05-04]. ISSN 1544-1709. Dostupné z: doi:10.1370/afm.1993
- [61] *Legionelóza a její prevence (Základní informace pro odbornou i laickou veřejnost)* [online]. B.m.: Státní zdravotní ústav. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/voda/pdf/Legionelozy\\_veřejne\\_informace\\_2012.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/voda/pdf/Legionelozy_veřejne_informace_2012.pdf)
- [62] MUDRA, Radim, Irena MARTINKOVÁ, Marie FIEDOROVÁ a Danuše HANSLÍKOVÁ. Legionella aneb čert nikdy nespí. *Hygiena* [online]. 2014, **59(1)**, 37–40 [vid. 2018-05-04]. ISSN 18026281. Dostupné z: doi:10.21101/hygiena.a1211
- [63] WILDOVÁ, Olga. Počet lidí nakažených bakterií Legionellou stoupá. *MEDICINA.cz* [online]. 2017 [vid. 2018-05-05]. Dostupné z: <http://medicina.cz/clanky/11540/34/Pocet-lidi-nakazenych-bakterii-Legionellou-stoupa/>
- [64] TJHIE, J H, F J VAN KUPPEVELD, R ROOSEDAAL, W J MELCHERS, R GORDIJN, D M MACLAREN, J M WALBOOMERS, C J MEIJER a A J VAN DEN BRULE. Direct PCR enables detection of Mycoplasma pneumoniae in patients with respiratory tract infections. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 1994, **32(1)**, 11–16 [vid. 2018-05-03]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC262961/>
- [65] DUMKE, Roger, Christiane SCHNEE, Mathias W. PLETZ, Jan RUPP, Enno JACOBS, Konrad SACHSE, Gernot ROHDE a CAPNETZ Study GROUP. Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia spp. Infection in Community-Acquired Pneumonia, Germany, 2011–2012. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2015, **21(3)**, 426–434 [vid. 2018-05-05]. ISSN 1080-6040. Dostupné z: doi:10.3201/eid2103.140927
- [66] SNÍŽEK, Tomáš. Chlamydia pneumoniae na cestě od respiračního patogenu k extrapulmonálním onemocněním. *Remedia* [online]. 2010, **5/2010**. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Okruhy-temat/Mikrobiologie-a-infekcni-choroby/Chlamydia-pneumoniae-na-cestech-od-respiracniho-patogenu-k-extrapulmonalnim-onemocnenim/8-1c-Xq.magarticle.aspx>
- [67] DE GIGLIO, Osvalda, Christian NAPOLI, Grazia LOVERO, Giusy DIELLA, Serafina RUTIGLIANO, Giuseppina CAGGIANO a Maria Teresa MONTAGNA. Antibiotic susceptibility of Legionella pneumophila strains isolated from hospital water systems in Southern Italy. *Environmental Research* [online]. 2015, **142**, 586–590 [vid. 2018-05-09]. ISSN 0013-9351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2015.08.013

- [68] SHADOUD, Lubana, Iyad ALMAHMOUD, Sophie JARRAUD, Jérôme ETIENNE, Sylvie LARRAT, Carole SCHWEBEL, Jean-François TIMSIT, Dominique SCHNEIDER a Max MAURIN. Hidden Selection of Bacterial Resistance to Fluoroquinolones In Vivo: The Case of Legionella pneumophila and Humans. *EBioMedicine* [online]. 2015, **2**(9), 1179–1185 [vid. 2018-05-09]. ISSN 2352-3964. Dostupné z: doi:10.1016/j.ebiom.2015.07.018
- [69] DESCOURS, Ghislaine, Christophe GINEVRA, Nathalie JACOTIN, Françoise FOREY, Joëlle CHASTANG, Elisabeth KAY, Jerome ETIENNE, Gérard LINA, Patricia DOUBLET a Sophie JARRAUD. Ribosomal Mutations Conferring Macrolide Resistance in Legionella pneumophila. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2017, **61**(3) [vid. 2018-05-09]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.02188-16
- [70] MASSIP, Clémence, Ghislaine DESCOURS, Christophe GINEVRA, Patricia DOUBLET, Sophie JARRAUD a Christophe GILBERT. Macrolide resistance in Legionella pneumophila: the role of LpeAB efflux pump. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2017, **72**(5), 1327–1333 [vid. 2018-05-09]. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkw594
- [71] MERCANTE, Jeffrey W. a Jonas M. WINCHELL. Current and Emerging Legionella Diagnostics for Laboratory and Outbreak Investigations. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2015, **28**(1), 95–133 [vid. 2018-05-05]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00029-14
- [72] CARRIM, Maimuna, Nicole WOLTER, Alvaro J. BENITEZ, Stefano TEMPIA, Mignon DU PLESSIS, Sibongile WALAZA, Fahima MOOSA, Maureen H. DIAZ, Bernard J. WOLFF, Florette K. TREURNICHT, Orienka HELLFERSCEE, Halima DAWOOD, Ebrahim VARIAVA, Cheryl COHEN, Jonas M. WINCHELL a Anne VON GOTTBURG. Epidemiology and Molecular Identification and Characterization of Mycoplasma pneumoniae, South Africa, 2012–2015. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2018, **24**(3), 506–513 [vid. 2018-05-05]. ISSN 1080-6040. Dostupné z: doi:10.3201/eid2403.162052
- [73] BROWN, Rebecca J., Patrick NGUIPDOP-DJOMO, Hongxin ZHAO, Elaine STANFORD, O. Brad SPILLER a Victoria J. CHALKER. Mycoplasma pneumoniae Epidemiology in England and Wales: A National Perspective. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, **7** [vid. 2018-05-05]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.00157
- [74] DÉGRANGE, S., H. RENAUDIN, A. CHARRON, S. PEREYRE, C. BÉBÉAR a C. M. BÉBÉAR. Reduced susceptibility to tetracyclines is associated in vitro with the presence of 16S rRNA mutations in Mycoplasma hominis and Mycoplasma pneumoniae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2008, **61**(6), 1390–1392 [vid. 2018-05-09]. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkn118
- [75] VIDIA-DIAGNOSTIKA, SPOL. S R.O. *Ceník pro samoplátce* [online]. 2016 [vid. 2018-04-26]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/17519478-Cenik-pro-samoplatce.html>

- [76] *Ceník zdravotních výkonů poskytovaných za úhradu* [online]. B.m.: Oblastní nemocnice Příbram. 2017. Dostupné z: <http://www.nemocnicepribram.cz/pdf/ceniky/CENIKMIK01.pdf>
- [77] DIONNE, Michel, Todd HATCHETTE a Kevin FORWARD. Clinical utility of a Legionella pneumophila urinary antigen test in a large university teaching hospital. *The Canadian Journal of Infectious Diseases* [online]. 2003, **14**(2), 85–88 [vid. 2018-04-27]. ISSN 1180-2332. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2094914/>
- [78] *Ceník laboratorních vyšetření pro samoplátce* [online]. B.m.: Slezská nemocnice v Opavě. 2017. Dostupné z: <https://www.snopava.cz/files/verejnost/cenik-centralni-laboratore-mikrobiologie-2017.pdf>
- [79] *Ceník mikrobiologie* [online]. B.m.: Česká Laboratorní, s.r.o. 2018. Dostupné z: <http://www.ceskalaboratorni.cz/download/54/cenik-mikrobiologie.pdf>
- [80] LINDSAY, Diane S. J., William H. ABRAHAM, William FINDLAY, Peter CHRISTIE, Fiona JOHNSTON a Giles F. S. EDWARDS. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to Legionella pneumophila serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2004, **53**(Pt 3), 183–187. ISSN 0022-2615. Dostupné z: doi:10.1099/jmm.0.05464-0
- [81] BRUIN, J. P. a B. M. W. DIEDEREN. Evaluation of Meridian TRU Legionella®, a new rapid test for detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in urine samples. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* [online]. 2013, **32**(3), 333–334. ISSN 1435-4373. Dostupné z: doi:10.1007/s10096-012-1745-0
- [82] *Jednokrokový kazetový test pro detekci Legionella pneumophila ze vzorku moči* [online]. B.m.: VIDIA-DIAGNOSTIKA, spol. s r.o. Dostupné z: [https://www.vidia.cz/images/stories/Navody\\_2016\\_CZ/Legionella%20Card\\_nov%20are%2006-2013.pdf](https://www.vidia.cz/images/stories/Navody_2016_CZ/Legionella%20Card_nov%20are%2006-2013.pdf)
- [83] *Legionella Urinary Antigen*. B.m.: DIESSE Diagnostica Senese. 2015
- [84] MALAN, Annette K., Thomas B. MARTINS, Troy D. JASKOWSKI, Harry R. HILL a Christine M. LITWIN. Comparison of Two Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays with an Immunofluorescence Assay for Detection of Legionella pneumophila Types 1 to 6. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2003, **41**(7), 3060–3063 [vid. 2018-04-27]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.41.7.3060-3063.2003
- [85] *Legionella pneumophila IgG ELISA* [online]. B.m.: Tecan. [vid. 2018-04-27]. Dostupné z: <http://www.ibl-international.com>
- [86] *CHORUS LEGIONELLA PNEUMOPHILA 1–6 IgG* [online]. B.m.: DIESSE Diagnostica Senese. 2015. Dostupné z: [http://www.diesse.it/\\_files/uploads/81090%20CZ-RO-DE%20Legionella%20IgG%201-6%20%202015.09.14.pdf](http://www.diesse.it/_files/uploads/81090%20CZ-RO-DE%20Legionella%20IgG%201-6%20%202015.09.14.pdf)

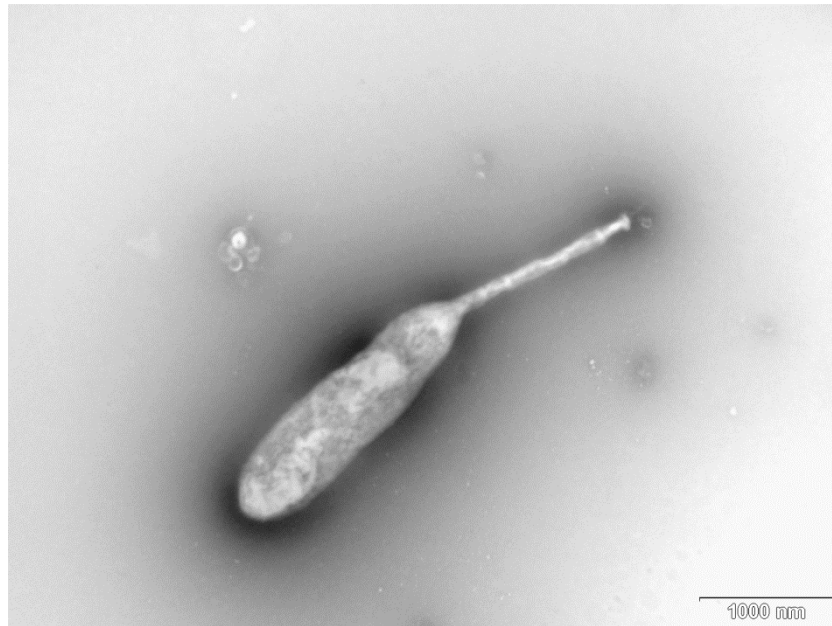
- [87] *Ceník služeb EUC Laboratoře s.r.o. (od 18. 12. 2017) pro samoplátce* [online]. B.m.: EUC Laboratoř s.r.o. 2017. Dostupné z: [https://www.euclaboratore.cz/odberovamista/cenik-laboratori-euc-pdf/F%2048%20cen%C3%ADk%20EUC%20Laborato%C5%99e%20s.r.o.\\_18.12.2017.pdf](https://www.euclaboratore.cz/odberovamista/cenik-laboratori-euc-pdf/F%2048%20cen%C3%ADk%20EUC%20Laborato%C5%99e%20s.r.o._18.12.2017.pdf)
- [88] DIEDEREN, Bram M. W., Jan A. J. W. KLUYTMANS, Christina M. VANDENBROUCKE-GRAULS a Marcel F. PEETERS. Utility of Real-Time PCR for Diagnosis of Legionnaires' Disease in Routine Clinical Practice. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2008, **46**(2), 671–677 [vid. 2018-05-04]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01196-07
- [89] *Ceník laboratorních vyšetření* [online]. B.m.: Mediekos Labor, s.r.o. Dostupné z: <http://www.mediekoslabor.cz/images/downloads/cenyvysetreni.pdf>
- [90] *Imunoenzymatické soupravy k diagnostice mykoplazmové infekce* [online]. B.m.: TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. leden 2018. Dostupné z: [http://www.testlinecd.cz/file/105/Mycoplasma\\_CZ.pdf?version=201802021020](http://www.testlinecd.cz/file/105/Mycoplasma_CZ.pdf?version=201802021020)
- [91] *Mycoplasma pneumoniae ELISA (recombinant) IgG / IgM Testkit IgA-Set* [online]. B.m.: Virotech Diagnostics GmbH. 12 2016. Dostupné z: [http://www.virotechdiagnostics.com/fileadmin/user\\_upload/Doc/AL/AL\\_EC114.00e.pdf](http://www.virotechdiagnostics.com/fileadmin/user_upload/Doc/AL/AL_EC114.00e.pdf)
- [92] RASZKA, J., J. JANUŠKA, H. RULÍŠKOVÁ, D. TOMISOVÁ a H. ZELENÁ. Zkušenosti se sérologickou diagnostikou Mycoplasma pneumoniae. *Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě Centrum mikrobiologie, parazitologie a imunologie Virologické oddělení* [online]. nedatováno. Dostupné z: <https://www.zuova.cz/Content/files/video-a-prezentace/ompovabac21.pdf>
- [93] GOURIET, F., P. -Y. LEVY, L. SAMSON, M. DRANCOURT a D. RAOULT. Comparison of the new InoDiag automated fluorescence multiplexed antigen microarray to the reference technique in the serodiagnosis of atypical bacterial pneumonia. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2008, **14**(12), 1119–1127 [vid. 2018-05-03]. ISSN 1198-743X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02119.x
- [94] *Mycoplasma pneumoniae IFA IgM* [online]. B.m.: Vircell microbiologists. Dostupné z: [http://www.peramed.com/peramed/docs/PMYPNM\\_8436040324745\\_EN.pdf](http://www.peramed.com/peramed/docs/PMYPNM_8436040324745_EN.pdf)
- [95] *Mycoplasma pneumoniae IgM* [online]. B.m.: DIAGNOSTIC AUTOMATION / CORTEZ DIAGNOSTICS, INC. 22. červenec 2013. Dostupné z: [http://www.rapidtest.com/pdf/Mycoplasma%20IgM\\_ELISA\\_8043-2Z\(07-22-2013\).pdf](http://www.rapidtest.com/pdf/Mycoplasma%20IgM_ELISA_8043-2Z(07-22-2013).pdf)
- [96] *GeneProof Mycoplasma pneumoniae PCR Kit* [online]. B.m.: GeneProof. [vid. 2018-04-27]. Dostupné z: <http://www.geneproof.com/en/products/diagnostic-kits/microbiological-dna-diagnostics/geneproof-mycoplasma-pneumoniae-pcr-kit>

- [97] *Imunoenzymatické soupravy k diagnostice chlamydiových infekcí* [online]. B.m.: TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. srpen 2017. Dostupné z: [http://www.testlinecd.cz/file/67/Chlamydia\\_CZ.pdf](http://www.testlinecd.cz/file/67/Chlamydia_CZ.pdf)
- [98] *Anti-Chlamydia pneumoniae ELISA (IgG)* [online]. B.m.: Euroimmun, a PerkinElmer company. Dostupné z: [https://www.euroimmun.com/documents/Indications/Infections/Chlamydia/EI\\_2192\\_D\\_UK\\_B.pdf](https://www.euroimmun.com/documents/Indications/Infections/Chlamydia/EI_2192_D_UK_B.pdf)
- [99] VIDIA SPOL. S R.O. *ELISA-VIDITEST anti-Chlamydia pneumoniae* [online]. 2014 [vid. 2018-05-03]. Dostupné z: [https://www.vidia.cz/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2&Itemid=125](https://www.vidia.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=2&Itemid=125)
- [100] *Chlamydia pneumoniae ELISA* [online]. B.m.: Demeditec Diagnostics GmbH. 2017. Dostupné z: <https://www.demeditec.com/en/products/infectious-disease>
- [101] *Ceník laboratorních vyšetření* [online]. B.m.: Imalab s.r.o. Dostupné z: <http://www.imalab.cz/images/file/IMA-001C.pdf>
- [102] *GeneProof Chlamydia pneumoniae PCR Kit* [online]. B.m.: GeneProof. [vid. 2018-04-27]. Dostupné z: <http://www.geneproof.com/en/products/diagnostic-kits/microbiological-dna-diagnostics/geneproof-chlamidia-pneumoniae-pcr-kit>
- [103] KUOPPA, Yvonne, Jens BOMAN, Lena SCOTT, Urban KUMLIN, Iréne ERIKSSON a Annika ALLARD. Quantitative Detection of Respiratory Chlamydia pneumoniae Infection by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2002, **40**(6), 2273–2274 [vid. 2018-05-03]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: [doi:10.1128/JCM.40.6.2273-2274.2002](https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2273-2274.2002)

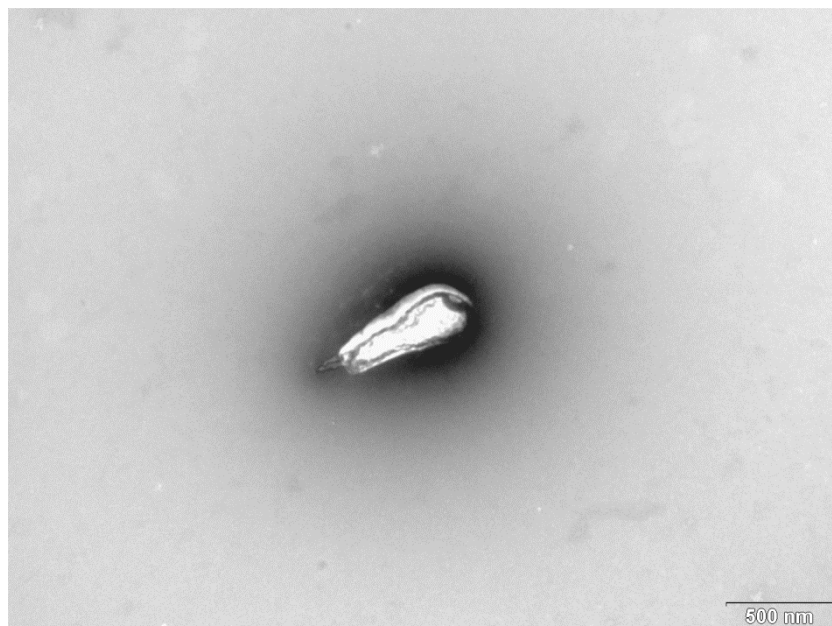
## 9 PŘÍLOHY

### Příloha 1

#### Příloha 1a - tyčka s bičkem

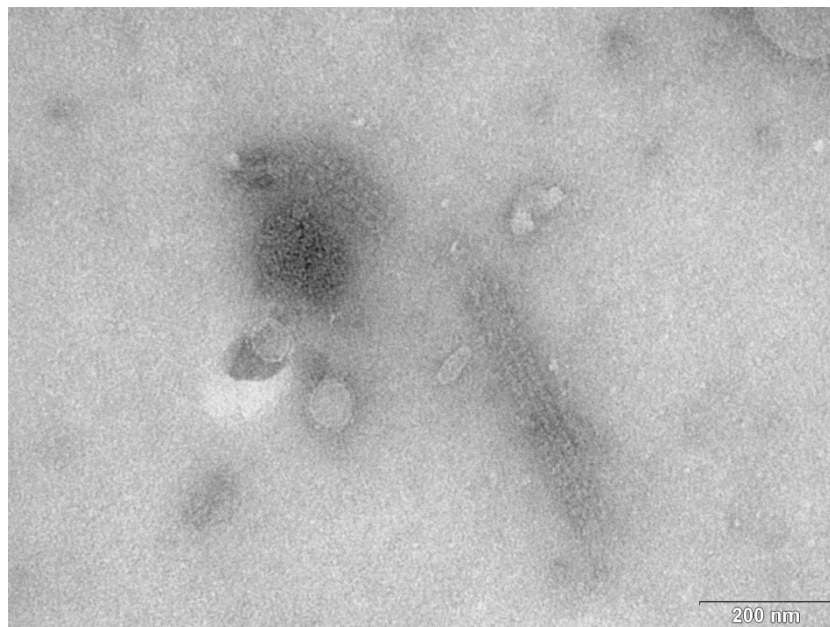


#### Příloha 1b - tyčka



## Příloha 2

### Příloha 2a – bakteriofág

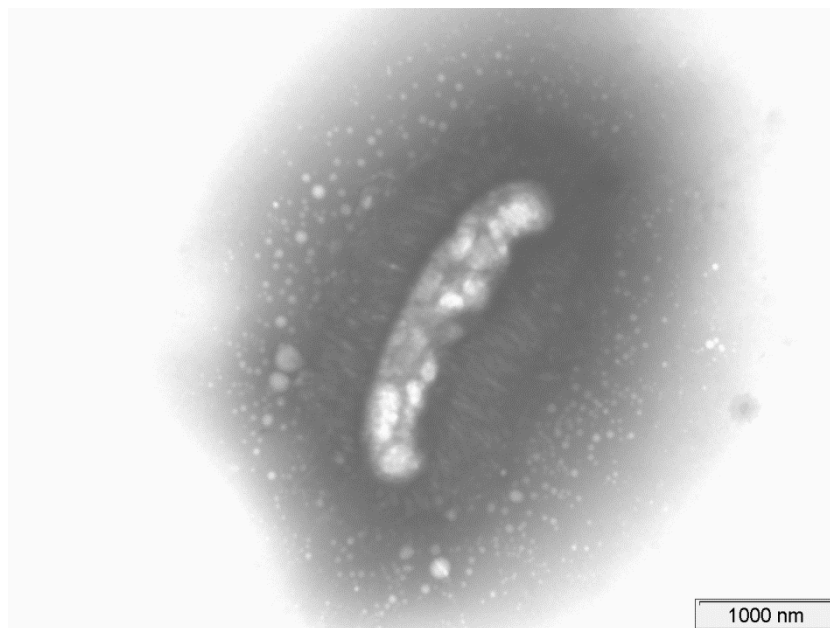


## Příloha 3

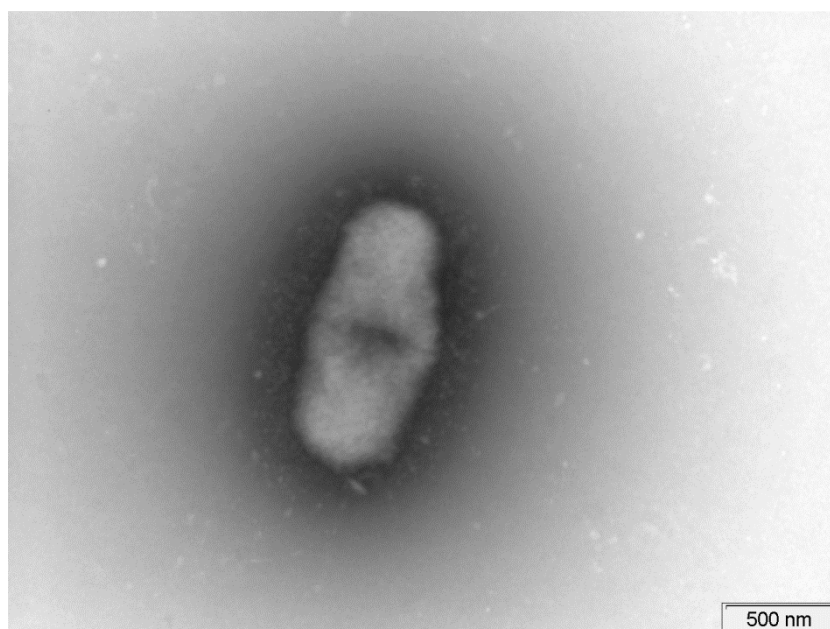
### Příloha 3a – diplokok



**Příloha 3b – tyčka**



**Příloha 3c – tyčka**

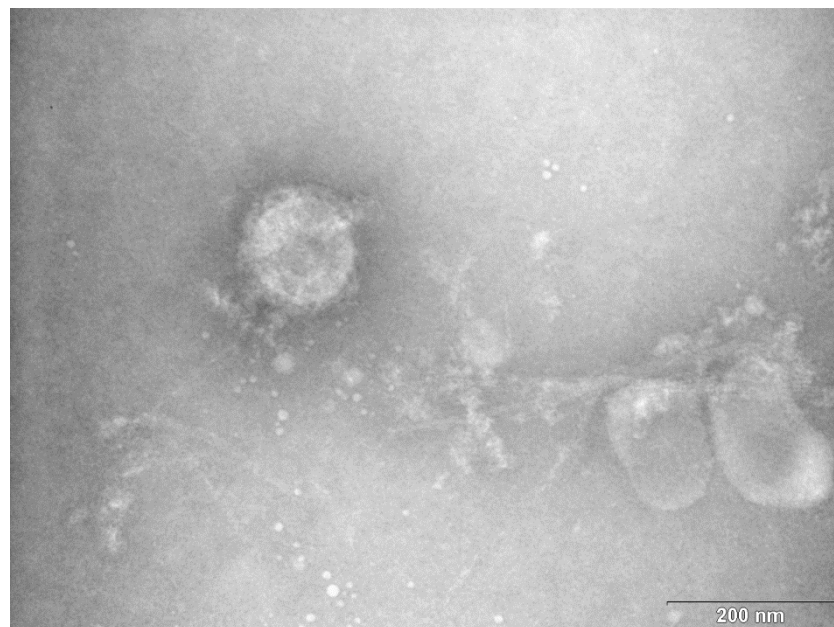


## Příloha 4

### Příloha 4a – shluk tyček

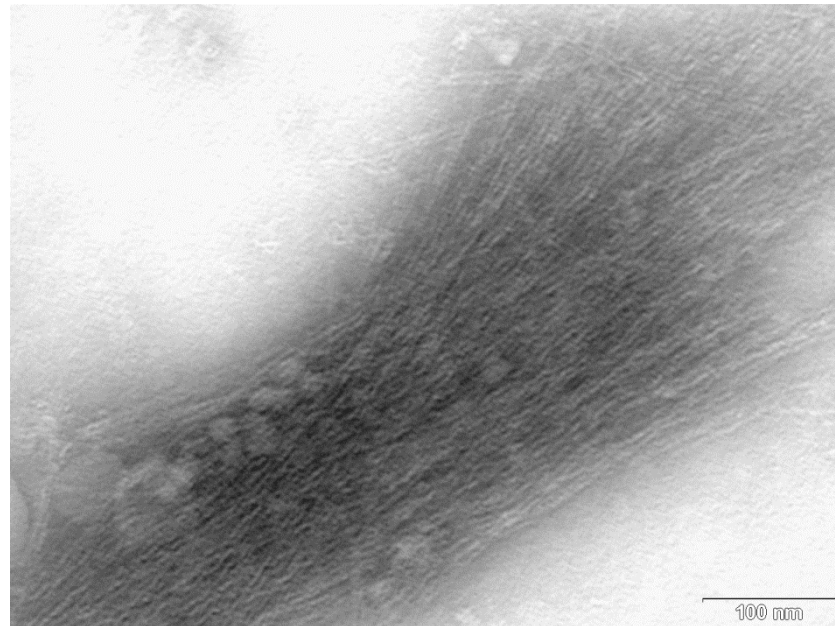


### Příloha 4b – bakteriofág

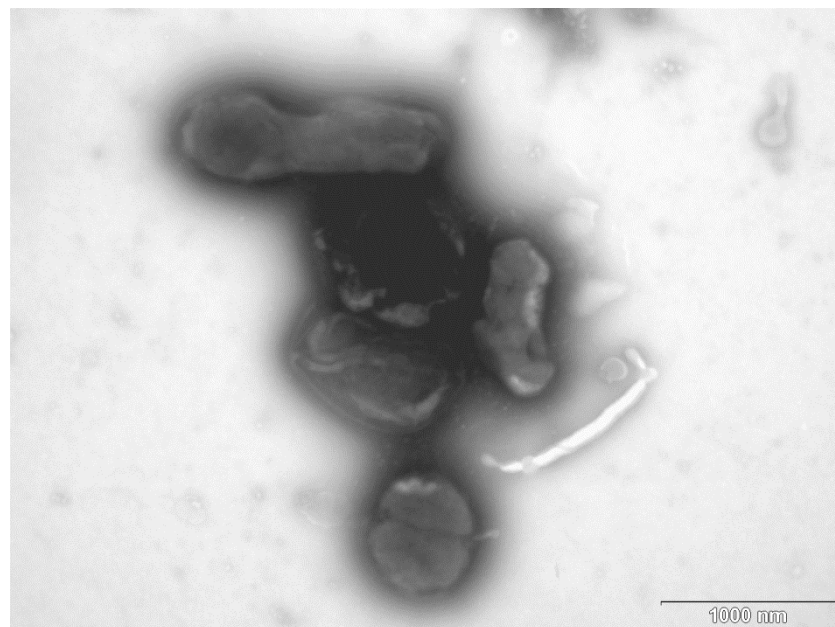


## Příloha 5

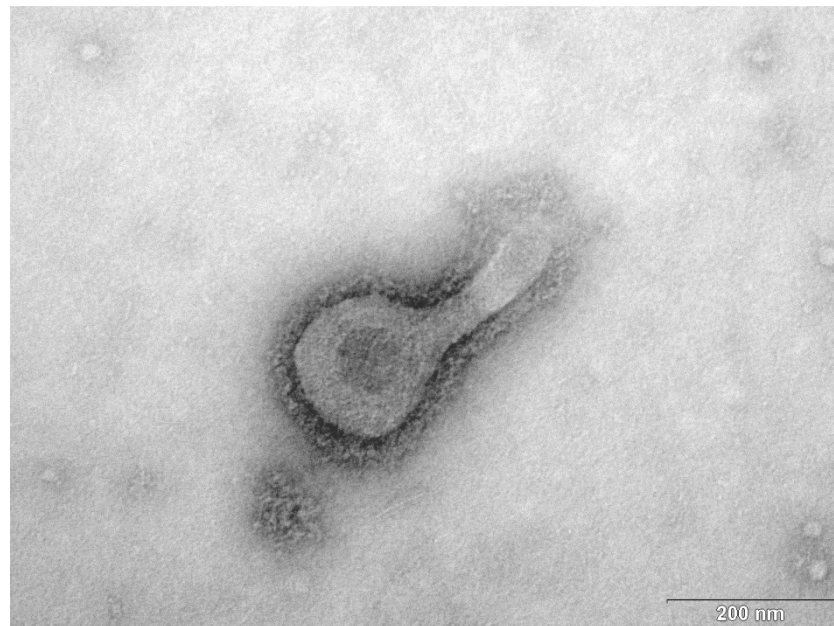
### Příloha 5a – bičíková vlákna bakteriofágu



### Příloha 5b – bakterie



**Příloha 5b – bakteriofág**

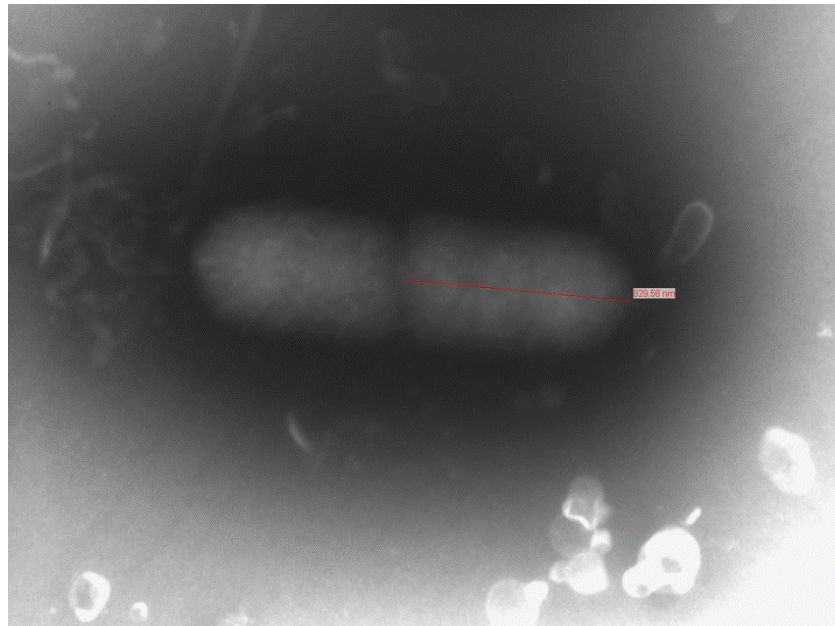


**Příloha 6**

**Příloha 6a – koky ve dvojicích (diplokoky)**

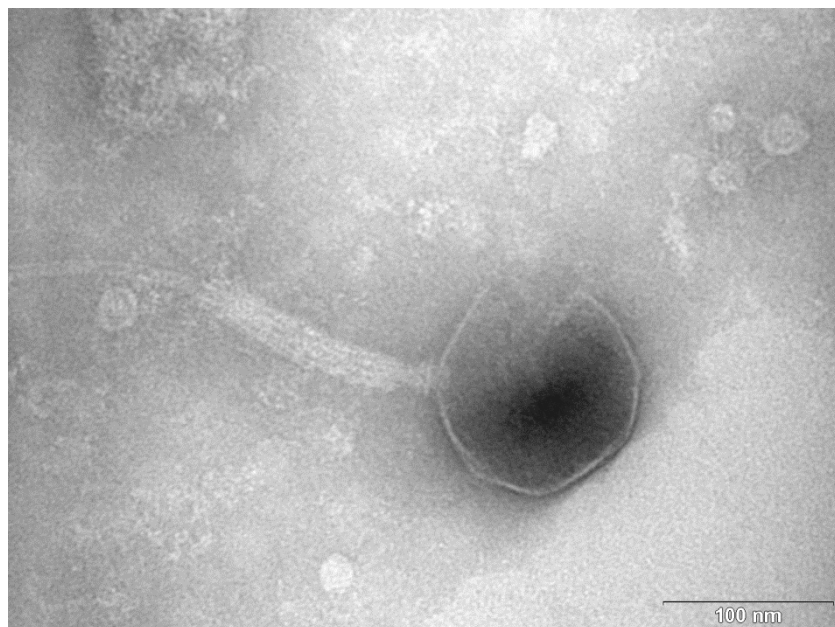


## Příloha 6b – tyčky

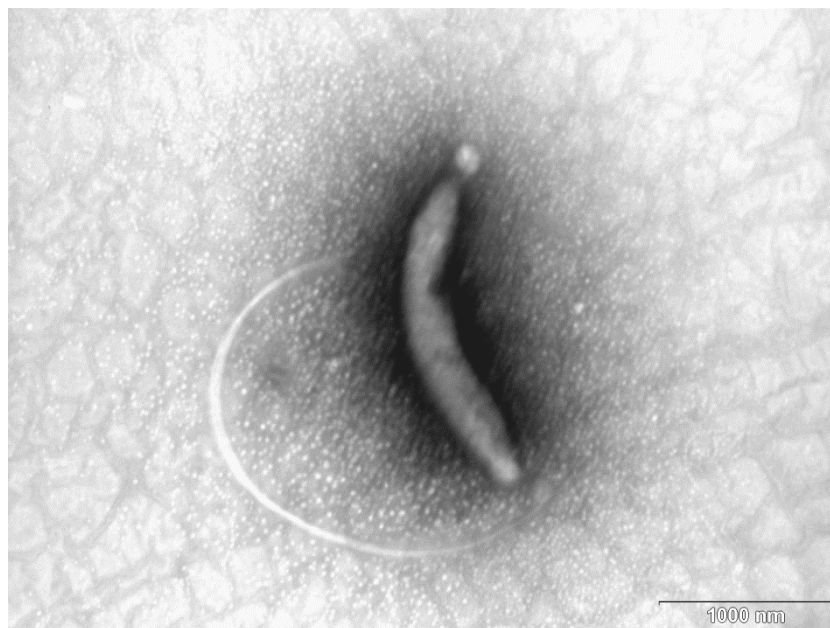


## Příloha 7

### Příloha 7a – bakteriofág



**Příloha 7b – tyčka**

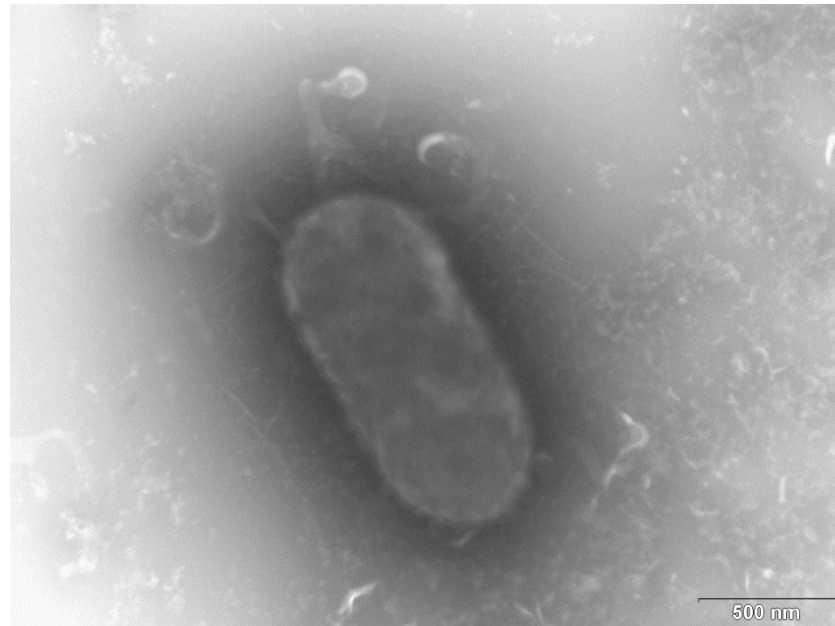


**Příloha 7c – tyčka**



## Příloha 8

### Příloha 8a – tyčka s fimbriemi



### Příloha 8b – tyčka

