

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Infekce *Mycoplasma pneumoniae*, laboratorní diagnostika a prevence

Markéta Janotová

Bakalářská práce

2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Markéta Janotová**
Osobní číslo: **C09277**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Infekce Mycoplasma pneumoniae, laboratorní diagnostika a prevence**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

Zpracujte literární rešerši obsahující:

1. Charakteristika Mycoplasma pneumoniae
2. Onemocnění, které způsobuje, včetně patogeneze
3. Epidemiologie
4. Laboratorní diagnostika
5. Možnosti terapie a prevence

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **ca 30 stran**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Radek Sleha

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **3. října 2011**

Termín odevzdání bakalářské práce: **22. června 2012**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 22. 6. 2012

Markéta Janotová

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce panu Mgr. Radku Slehovi za jeho odborné vedení, množství rad a za strávený čas při tvorbě této práce.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá patogenní bakterií *Mycoplasma pneumoniae*, vyvolávající časté infekce respiračního traktu u lidí. V práci jsou shrnuty dostupné informace o onemocněních, které uvedený mikroorganismus způsobuje. Dále jsou uvedeny postupy laboratorní diagnostiky, možnosti terapie a prevence. Pozornost je věnována rovněž i charakterizaci bakterie, kdy jsou zmíněny informace o její taxonomii, morfologii a patogenezi.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mycoplasma pneumoniae, *Mollicutes*, infekce, laboratorní diagnostika, léčba a prevence

TITLE

Infection of *Mycoplasma pneumoniae*, laboratory diagnostics and prevention

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the pathogenic bacterium *Mycoplasma pneumoniae*, the causative agent of human respiratory tract infections. The work summarizes available information on diseases caused by this bacterium. Attention is paid also to bacterial characteristics which are summed up in the chapters Taxonomy, Morphology and Pathogenesis. Furthermore, the methods of identification, therapy and prevention are mentioned.

KEYWORDS

Mycoplasma pneumoniae, *Mollicutes*, infection, laboratory diagnostics, treatment and prevention

SEZNAM ZKRATEK

ATB	antibiotikum
ATP	adenosintrifosfát
BAL	bronchoalveolární laváž
CNS	centrální nervová soustava
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EIA	enzymová imunoanalýza (z angl. Enzyme Immunoassay)
ELISA	test enzymové imunoanalýzy (z angl. Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay)
IgA	imunoglobulin třídy A
IgE	imunoglobulin třídy E
IgM	imunoglobulin třídy M
IL-6	interleukin-6
INF-gama	interferon-gama
kbp	páry kilobází
KFR	komplement-fixační reakce (z angl. Complement-fixation reaction)
M.	<i>Mycoplasma</i>
MIC	minimální inhibiční koncentrace
PAP	primární atypická pneumonie
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)
PPLO	pleuropneumonii podobné organismy (z angl. Pleuro-pneumonia-like-organism)
RIT	test inhibice růstu
sp.	druh (z lat. <i>species</i>)
TNF-alfa	tumor necrosis factor-alfa

OBSAH

1	ÚVOD	9
1.1	HISTORIE	10
1.2	TAXONOMIE	10
1.3	MORFOLOGIE A DĚLENÍ BUNĚK.....	11
1.4	GENETICKÉ VLASTNOSTI	12
1.5	BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI	13
1.6	CITLIVOST K VNĚJŠÍM PODMÍNKÁM	13
1.7	ANTIGENNÍ STRUKTURY	14
2	PATOGENEZE	15
2.1	ADHEZE NA HOSTITELSKOU BUŇKU	15
2.2	INTRACELULÁRNÍ VÝSKYT.....	15
2.3	CYTOTOXICITA	15
2.4	IMUNITNÍ ODPOVĚĎ A PRODUKCE CYTOKINŮ	16
3	ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÉ <i>M. PNEUMONIAE</i>.....	17
3.1	PŘENOS A VÝSKYT.....	17
3.2	INFEKCE RESPIRAČNÍHO TRAKTU	18
3.3	EXTRARESPIRAČNÍ INFEKCE	19
4	LÉČBA A PREVENCE	21
4.1	CITLIVOST K ANTIMIKROBIÁLNÍM LÁTKÁM	21
4.2	PREVENCE	22
5	LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA	23
5.1	VYŠETŘOVANÝ MATERIÁL.....	23
5.2	PŘÍMÁ LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA.....	23
5.2.1	<i>Kultivace a růstové vlastnosti.....</i>	<i>23</i>
5.2.2	<i>Molekulárně-biologické metody.....</i>	<i>24</i>
5.3	OSTATNÍ METODY PRŮKAZU	25
6	ZÁVĚR	27
7	SEZNAM LITERATURY	28

1 ÚVOD

Mycoplasma pneumoniae je významný patogen respiračního traktu, způsobující infekce horních i dolních cest dýchacích u lidí. Časté jsou především faryngitidy, bronchitidy a tracheitidy, které mohou vyústit až v závažné pneumonie. Značné riziko představuje *Mycoplasma pneumoniae* zejména pro děti trpící astmatem.

Vedle onemocnění dýchacích cest je *Mycoplasma pneumoniae* původcem i extrapulmonárních komplikací jako je postižení centrální nervové soustavy a srdeční svaloviny. Vzácně byly zaznamenány i infekce s kožními projevy, případně postižení jiných orgánů (ledviny).

Klinický materiál k průkazu onemocnění vyvolaných *Mycoplasma pneumoniae* se odebírá dle charakteru postižení. U respiračních infekcí se provádí především záchyt ze sputa nebo výtěrů z nosohltanu. Další možností je detekce uvedeného agens z bronchoalveolárních laváží.

Tradiční kultivační technika pro detekci a identifikaci mykoplasmat je pracná, vzhledem k jejich vysokým růstovým požadavkům. Ke kultivaci se využívají PPLO bujónová a agarová média. V důsledku malých velikostí bakterií je k jejich pozorování nutno užít elektronové mikroskopie. Moderní metody průkazu jsou založeny na molekulárně biologických technikách, zejména polymerázové řetězové reakci. V diagnostice *Mycoplasma pneumoniae* je možno využít i metod nepřímé diagnostiky, kdy jsou detekovány specifické protilátky metodami ELISA nebo komplement fixační reakcí.

V terapii infekcí způsobených *Mycoplasma pneumoniae* jsou aplikována především tetracyklinová a makrolidová antibiotika s bakteriostatickým účinkem. U komplikovaných infekcí se využívají i fluorochinolony působící baktericidně. V současné době narůstá počet hlášení o zvyšující se odolnosti *Mycoplasma pneumoniae* vůči makrolidům. Vakcína chránící před onemocněními *Mycoplasma pneumoniae* nebyla doposud registrována.

Cílem bakalářské práce je vytvořit literární rešerši, zabývající se infekcemi *Mycoplasma pneumoniae*, jeho laboratorní diagnostikou, možnostmi terapie a prevence.

1.1 Historie

První mykoplasma izolovali v roce 1898 Nocard a Roux ze skotu postiženého pleuropneumonií. Původce onemocnění byl později označen jako *Mycoplasma (M.) mycoides* (Nocard a Roux, 1898). Dienes a Edsall (1937) prokázali poprvé zástupce mykoplasmat v souvislosti s onemocněním u lidí. Jednalo se patrně o *M. hominis* vykultivované z abscesu Bartholiniho žlázy.

M. pneumoniae bylo poprvé izolováno v roce 1944 ze sputa pacienta s primární atypickou pneumonií (Eaton et al., 1944). Mikroorganismus byl označen jako tzv. „Eatonovo agens“. Marmion a Goodburn (1961) zařadili Eatonovo agens mezi tzv. PPLO (z angl. Pleuro-pneumonia-like-organism). Chanock et al. (1963) přejmenovali později Eatonovo agens na *M. pneumoniae*.

Delší dobu byla mykoplasmata považována za virové částice (Meiklejohn et al., 1945). Napovídala tomu nepřítomnost buněčné stěny, umožňující mykoplasmatům procházet skrze bakteriologické filtry i jejich vysoká kultivační náročnost. Na základě schopnosti růstu na bezbuněčných médiích byla mykoplasmata v 60. letech 20. století definitivně zařazena mezi prokaryota (Chanock et al., 1962).

1.2 Taxonomie

Mykoplasmata byla původně označena jako PPLO organismy. Od roku 1960 se tyto mikroorganismy zařazují do třídy zvané *Mollicutes*, kde název pochází z latinského slova měkké („mollis“) a kůže („cutis“) (Waites et al, 2003). Taxonomie této třídy byla značně revidována na základě analýzy 16S rRNA (Johansson a Petterson, 2002).

Třída *Mollicutes* obsahuje pět čeledí (Davis, 2011). Čeleď *Mycoplasmataceae*, která zahrnuje organismy infikující a kolonizující člověka a zvířata. Dále *Spironoplasmataceae*, představující organismy infikující rostliny a *Acholeplasmataceae*, z nichž většina je izolována především z ptáků. *Anaeroplasmataceae* se skládá z přísných anaerobů, které byly izolovány z bacheru skotu a ovcí. Čeleď *Entomoplasmataceae* infikuje hmyz a rostliny.

Nejznámějším rodem třídy *Mollicutes* je rod *Mycoplasma*. Jedná se o parazity lidí, zvířat a rostlin. Mnoho mykoplasmat způsobuje onemocnění u člověka, spojené

s buňkami dýchacího nebo urogenitálního traktu. Rod *Mycoplasma* zahrnuje více než 13 druhů, které mohou vyvolat infekce u lidí (Pitcher, 2005).

Třída: *Mollicutes*

Řád: *Mycoplasmatales*

Čeleď: *Mycoplasmataceae*

Rod: *Mycoplasma*

Druh: *Mycoplasma pneumoniae*

1.3 Morfologie a dělení buněk

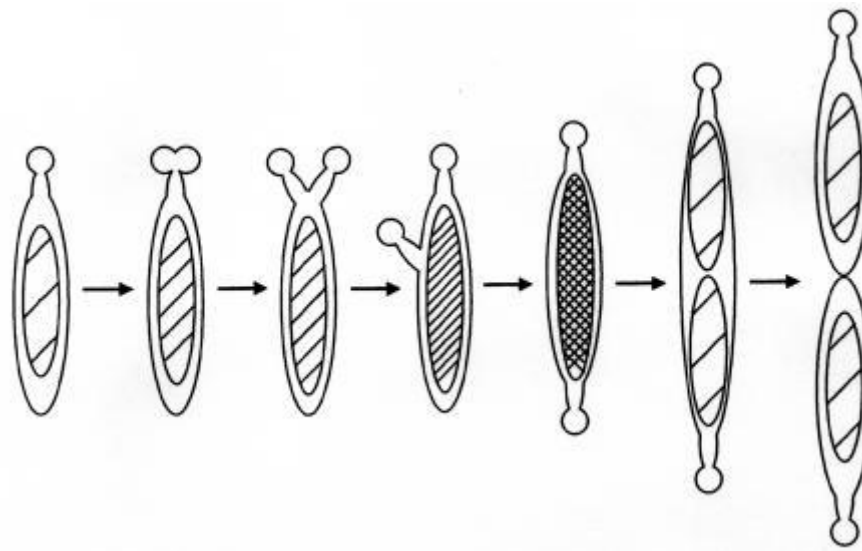
Mykoplasmata jsou nejmenší mikroorganismy schopné samostatného množení a existence mimo hostitelskou buňku (Waites a Talkington, 2004).

Velikost buněk mykoplasmat se pohybuje v rozmezí 200 - 300 nm. Malá velikost buněk dává mykoplasmatům schopnost procházet bakteriologickými filtry, běžně užívanými ke sterilizaci kultivačních médií. V důsledku redukované velikosti buněčné hmoty nelze buňky mykoplasmat pozorovat ve světelném mikroskopu. Při kultivaci v tekutých živných médiích neprodukují viditelný zákal (Waites a Talkington, 2004).

Dalším charakteristickým znakem mykoplasmat je absence pevné (rigidní) buněčné stěny, jejíž funkci nahrazuje tenká třívrstevná membrána (7,5 - 10 nm) složená z fosfolipidů, proteinů a cholesterolu. Tato membrána je příčinou značné plasticity a pleomorfního charakteru bakteriálních buněk. Navzdory genetické příbuznosti s gram-pozitivními bakteriemi nepřítomnost buněčné stěny brání úspěšnému barvení dle Grama (Sánchez-Vargas a Gómez-Duarte, 2007).

Schopnost vytvářet pravidelnou morfologii buněk u *M. pneumoniae* je dána přítomností vláknitého cytoskeletárního systému v buněčné membráně. Cytoskelet je tvořen různými vláknitými bílkovinami, které jsou pro třídu *Mollicutes* unikátní (Miyata a Ogaki, 2006; Waites a Talkington, 2004). *M. pneumoniae* má tvar malých kokovitých tělísek, ve starších kulturách oválných až protáhlých forem. Na povrchu buňky se nachází „kontaktní destička“ membrány významná pro adhezi.

M. pneumoniae si stejně jako ostatní zástupci třídy *Mollicutes* vyvinula speciální reprodukční cyklus v důsledku přizpůsobení se existenci s omezeným genomem a parazitním způsobem života (Dandekar et al., 2002). Mykoplasmata se množí jednoduchým binárním dělením, při kterém nemusí být dělení cytoplasmy synchronizováno s replikací jádra. Tímto opožděným dělením cytoplasmy vznikají mnohojaderná vlákna a řetízky, která se mohou opět rozpadat na základní elementy (Balish a Krause, 2002; Taylor-Robinson, 1999).



Obrázek č. 1: Schéma binárního dělení buněk *M. pneumoniae* (Waites a Talkington, 2004)

1.4 Genetické vlastnosti

Třída *Mollicutes* obsahuje organismy s chybějícími geny nezbytnými pro syntézu peptidoglykenu buněčné stěny (Waites a Talkington, 2004).

Genom *M. pneumoniae* byl kompletně osekvenován v roce 1996 (Himmelreich et al, 1996). Genetická informace je uložena v cirkulární dvoušroubovicové DNA (Wojtowicz, 2002). Její velikost dosahuje přibližně velikosti 816,394 kbp a obsahuje 687 kódujících sekvencí. V porovnání s *Escherichia coli* je genom *M. pneumoniae* přibližně pětikrát menší (Rudd, 2000).

Redukovaná velikost genomu *M. pneumoniae* je příčinou omezených biosyntetických vlastností a zvýšených nutričních požadavků organismu na kultivaci *in-vitro* (Waites a Talkington, 2004). Předpokládá se, že *M. pneumoniae* vznikla degenerativní evolucí, kdy se vyvinula ze složitějších gram-pozitivních bakterií. Během této evoluce *M. pneumoniae* ztratilo schopnost kódování buněčné stěny, několika bílkovin a purinů (Wojtowicz, 2002).

Johansson a Pettersson (2002) popisují ve své publikaci výjimečné postavení *M. pneumoniae* mezi zástupci třídy *Mollicutes*, díky vysokému obsahu cytosinu a guaninu (41 mol%) v DNA. U ostatních mykoplasmat se obsah cytosinu a guaninu pohybuje v rozmezí nižším než 30 mol%.

Waites a Talkington (2004) uvádí další unikátní vlastnost *Mycoplasma sp.*, a to použití univerzálního stop kodonu UGA odpovídající tryptofanu.

1.5 Biochemické vlastnosti

V DNA mykoplasmat chybí téměř všechny geny potřebné pro biosyntézu aminokyselin, mastných kyselin, kofaktorů a vitamínů a proto jsou tyto organismy závislé na dodávce metabolických prekurzorů od hostitelů (Katz a Waites, 2004).

M. pneumoniae je schopno fermentovat glukózu, která je hlavním zdrojem pro syntézu ATP. Zkvašování glukózy probíhá až na kyselinu mléčnou. Další významnou biochemickou vlastností *M. pneumoniae* je redukce tetrazolia na červený formazán, která může probíhat aerobně nebo anaerobně. Těto schopnosti se využívá dodnes k odlišení tohoto mikroorganismu od jiných, podobně rostoucích druhů, obývajících rovněž respirační trakt člověka (Dandeker et al., 2002).

M. pneumoniae mohou využít glukózu, fruktózu a glycerol jako jediné zdroje uhlíku (Hames et al., 2009).

1.6 Citlivost k vnějším podmínkám

Mykoplasmata jsou citlivá na vyschnutí a teplotu nad 50 °C. Mimo hostitele jsou však patogenní druhy schopny přežít v prostředí chráněném před slunečním zářením i několik dní (Quinn et al., 1994). Většina mykoplasmat je usmrcena při vystavení teplotě 56 °C po dobu 30 minut.

Mykoplasmata jsou nejlépe uchovávána při teplotě -70 °C po dobu 42 měsíců. V tekutém dusíku je zachována stabilita mykoplasmat po dobu 3 – 9 let. Lyofilizované mikroorganismy v kultivačním médiu mohou přežít až 20 let, uchována při 0 – 5 °C.

Mykoplasmata jsou rozpustná ve žluči a růst druhů vyžadujících steroly je inhibován digitoninem (Parker a Duerden, 1993).

1.7 Antigenní struktury

Na povrchu membrány *M. pneumoniae* se nachází řada proteinových, lipoproteinových nebo glykolipidových antigenů. Tyto struktury slouží především v adhezi na povrch hostitelské buňky a aktivaci imunitního systému k zánětlivé reakci. Významnou vlastností povrchových antigenů je jejich značná variabilita, která umožňuje *M. pneumoniae* odolávat imunitnímu systému hostitele (Melková, 2003). *M. pneumoniae* parazituje na povrchu buněk sliznice respiračního traktu.

Nejvýznamnějším antigenem *M. pneumoniae* je membránový protein P1, umožňující kolonizaci povrchu sliznic. Tento adhezín je současně virulentním faktorem, proti kterému je namířena rozhodující humorální odezva. Mimo přilnavosti hraje *M. pneumoniae* významnou roli v klouzavém pohybu a dělení buněk (Drasbek et al., 2007). O membránovém proteinu P1 se předpokládá, že má hlavní receptorovou funkci u *M. pneumoniae*. Existují značné informace o tom, které oblasti proteinu P1 zastávají funkce ve vazbě na receptory (Krause a Balish, 2001). Fragment C-terminální části proteinu P1 je imunogenní, jak ukazují séra pacientů s onemocněním způsobeným *M. pneumoniae*, kde byly reakce s těmito fragmenty prokázány (Drasbek et al., 2007)

P30 je dalším proteinem podílejícím se na adhezi na hostitelskou buňku. Protilátky vytvořené proti P30 mohou blokovat hemadsorpci *M. pneumoniae* (Waites a Talkington, 2004). Balish a Krause (2002) nedávno naznačili, že protein P30 může být zapojen do klouzavého pohybu buněk a koordinace dělení buněk (Waites a Talkington, 2004).

Mezi další antigenní struktury se řadí membránové proteiny P116 a HMW1 – 3, které jsou rovněž spojeny s adherencí. Změna nebo absence některého z těchto proteinů vede ke ztrátě virulence mykoplazmat (Chaudhry et al., 2007).

2 PATOGENEZE

M. pneumoniae jsou především patogeny vyskytující se na povrchu sliznic dýchacích cest, jejichž parazitární existence souvisí s epiteliálními buňkami svého hostitele (Waites a Talkington, 2004).

2.1 Adheze na hostitelskou buňku

M. pneumoniae po aspiraci do dýchacích cest proniká mukociliární vrstvou sliznice, kterou kolonizuje prostřednictvím adhezivních proteinů. Mykoplasmata přilnou na povrch hostitelských buněk, které následně ochuzují o aminokyseliny, mastné kyseliny, vitamíny a jiné nezbytné živiny (Toršová a Medková, 2001). Kolonizace dýchacích cest je počátečním krokem k infekci respiračního traktu a poškození tkání (Waites a Talkington, 2004).

2.2 Intracelulární výskyt

Mykoplasmata jsou především extracelulární paraziti, jejichž přežití závisí na úzkém kontaktu s hostitelskou buňkou. Přesto studie *in-vitro* prokázaly, že *M. pneumoniae* může pronikat skrze buněčné membrány a přežívat uvnitř napadených buněk (Yalovich et al., 2004).

Intracelulární existence *M. pneumoniae* může být důvodem pro vznik latentních nebo chronických stavů. Zároveň pomocí výskytu uvnitř buňky má možnost mikroorganismus unikat účinkům imunitních mechanismů hostitele a získat přístup k vnitřním tkáním. Intracelulární výskyt snižuje i účinnost některých léků (Rottem, 2002; Talkington et al., 2001). Spojení mykoplasmat s membránou hostitele může vést k uvolnění různých hydrolytických enzymů mikroorganismu, stejně jako k vložení některých membránových komponent do membrány hostitelské buňky (Rottem, 2002).

2.3 Cytotoxicita

Ke spuštění cytotoxických událostí a klinických projevů onemocnění není nutný průnik mykoplasmy do hostitelské buňky. Místní narušení hostitelské tkáně umožňuje uvolnění enzymatických a cytolytických metabolitů mikroorganismu přímo do buňky. Fúzí membrány bakterie do membrány hostitelské buňky může dojít k vložení bakteriálních membránových komponent do membrány hostitelské buňky (Sánchez-Vargas, 2007).

Vzhledem k redukované genetické informaci, postrádá *M. pneumoniae* některé enzymy, které jsou spojeny s virulencí u jiných bakterií, jako je např. superoxid dismutáza nebo kataláza (Waites a Talkington, 2004). Mayer (2010) uvádí, že peroxid vodíku i superoxid, které jsou produkty metabolismu mykoplasmat, představují významný faktor v patogenezi onemocnění. Projevem ultrastrukturálních účinků peroxidu na hostitelské buňky, jako jsou erythrocyty, je ztráta glutathionu, denaturace hemoglobinu a oxidace lipidů v erythrocytech, vedoucí až k lýze poškozených buněk. Somerson et al. (1965) potvrdil, že peroxid vodíku je molekula, která způsobuje hemolytickou aktivitu *M. pneumoniae*.

2.4 Imunitní odpověď a produkce cytokinů

Mykoplasmata jsou schopna aktivovat imunitní systém hostitele. Stimulují T a B lymfocyty k proliferaci a uvolňování cytokinů (Broaders et al., 2006). Esposito et al. (2002) zmiňuje spojitost produkce těchto cytokinů u infikovaných dětí se zhoršením příznaků astmatu. Studie na myších ukazují, že pomocné T – lymfocyty (T_H) jsou odpovědné za zvýšenou obstrukci dýchacích cest. Řasinkový epitel dýchacích cest je primárním místem infekce, kde *M. pneumoniae* indukuje tvorbu cytokinů s prozánětlivým účinkem, jako jsou TNF-alfa, IFN-gama a IL-6 (Sánchez-Vargas a Gómez-Duarte, 2007; Hardy et al., 2001).

Za možnou příčinu komplikací u onemocnění vyvolaných *M. pneumoniae* jsou považovány křížově reagující chladové aglutininy (Talkington et al., 2001).

3 ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÉ *M. PNEUMONIAE*

M. pneumoniae je nejčastější příčinou onemocnění dolních cest dýchacích u člověka, zejména u starších dětí, dospívajících a mladých dospělých (5 - 20 let). U dětí do pěti let jde zpravidla o záněty horních dýchacích cest, u větších dětí a mladistvých jde o bronchitidy nebo pneumonie (Havlík, 2009). Velké riziko pro vznik komplikací představuje deficit humorální imunity (Toršová a Medková, 2001).

3.1 Přenos a výskyt

Zdrojem nákazy je výhradně nemocný člověk (Sánchez-Vargas a Gómez-Duarte, 2007). *M. pneumoniae* je přenášeno pomocí aerosolu z člověka na člověka. Jedinci s aktivní infekcí obsahují mikroorganismy v nose, krku, průdušnicích a sputu. Přenos je usnadňován kašlem (Waites et al., 2005; Lin et al., 2002).

M. pneumoniae odpovídá za 15 – 20 % získaných komunitních pneumonií u lidí, což představuje výskyt 2 případů na 1000 osob/rok. Korppi et al. (2004) uvádí, že *M. pneumoniae* bylo zjištěno u 30 % dětí s komunitní pneumonií. Z toho ve více než 50 % případů u dětí ve věku 5 let a více let. Studie provedená ve Spojených státech zjistila, že komunitní pneumonie způsobená *M. pneumoniae* se vyskytuje u 23 % dětí ve věku 3 – 4 let (Block et al., 1995).

Vyšší výskyt mykoplasmových infekcí se objevuje v prostředích a institucích jako jsou nemocnice, sociální zařízení, vojenské tábory nebo vysokoškolské ubytovny (Klement et al., 2006). Přestože *M. pneumoniae* není součástí běžné mikroflóry a jeho přítomnost je často spojována s infekcí, může mikroorganismus přetrvávat uvnitř dýchacího ústrojí hostitele s proměnlivou dobou i po odeznění klinických projevů (Sánchez-Vargas a Gómez-Duarte, 2007). Vyšší výskyt pacientů s respiračními infekcemi způsobenými *M. pneumoniae* je v mírném klimatickém pásmu největší v létě, z důvodu nižšího výskytu jiných respiračních patogenů v uvedené době (Waites a Talkington, 2004; Porath et al., 2001).

Inkubační doba se obvykle pohybuje od 1 do 3 týdnů, i když někdy může trvat pouze 4 dny (Waites et al., 2005; Lin et al., 2002). Časté jsou bezpříznakové nákazy. Manifestní formy infekcí začínají s postupně se zvyšující horečkou, stoupajícím pocitem únavy, pálením v nosohltanu, bolestmi hlavy a později se připojí dráždivý suchý kašel. Vedle onemocnění

respiračního traktu může dojít k rozšíření infekce i mimo dýchací cesty do CNS nebo srdečního svalu.

Prognóza mykoplasmové pneumonie je zpravidla dobrá, ale překonání nemoci nezaručuje dlouhodobou odolnost (Havlík, 2009).

3.2 Infekce respiračního traktu

M. pneumoniae nejčastěji postihuje horní a dolní dýchací cesty (Waites et al., 2005). Způsobuje faryngitidy, tracheobronchitidy, bronchitidy, primární atypické pneumonie, zánět zvukovodu, bulózní hemorrhagickou myringitidu a jiné (Toršová a Medková, 2001). Infekce horních dýchacích cest zahrnuje příznaky jako bolesti v krku, chrapt, horečku, kašel, bolest hlavy, zimnici, rýmu, bolesti svalů, bolesti ucha a malátnost. Infekce dolních dýchacích cest je spojena obecně s kašlem, dušností, adenopatií a vzácně s respiračním selháním (Waites et al., 2005). *M. pneumoniae* způsobuje až 40 % případů komunitních pneumonií (Auvichayapat et al., 2006).

U dětí do 5 let se infekce většinou projevuje rýmou a sípáním. Postup do zápalu plic není obvyklý, zatímco u starších dětí ve věku 5 – 15 let je pravděpodobnost vzniku bronchopneumonie s nutností hospitalizace vyšší (Ferwerda et al., 2001).

Díky nedostatečné reakci na antimikrobiální terapii peniciliny nebo sulfonamidy začala být pneumonie způsobená *M. pneumoniae* odlišována od ostatních. Vzhledem k nejasné etiologii byl vytvořen termín „primární atypická pneumonie“ (Ferwerda, 2001).

Prvními příznaky pneumonie způsobené *M. pneumoniae* jsou horečka, malátnost, bolest hlavy a bolest v krku. Nejsou to typické příznaky pneumonie, odtud název primární atypická pneumonie. Příznaky mohou trvat několik týdnů, ale jen zřídka jsou natolik závažné, že onemocnění vede k hospitalizaci nebo úmrtí. Pro atypickou pneumonii vyvolanou tímto mikroorganismem je charakteristický bohatý rentgenový nález, v němž jsou typické bohaté nepravidelné infiltráty stěhovavého charakteru (Port, 2007).

Respirační infekce mohou být příčinou sípání u dětí a mohou ovlivnit vznik a závažnost astmatu prostřednictvím komplexních a propojených mechanismů. Infekce může vyvolat atopické astma a atopie. *M. pneumoniae* je považováno za původce komunitních pneumonií. Macdowell a Bacharier (2005) uvádí, že infekce způsobené *M. pneumoniae* mohou předcházet vzniku astmatu nebo zhoršit astmatické symptomy.

Akutní infekce *M. pneumoniae* může iniciovat astma u některých dříve asymptomatických pacientů případně u některých jedinců s atopií. Mechanismy interakce *M. pneumoniae* s lidskými dýchacími cestami jsou komplexní a multifaktoriální. Na zhoršení astmatu vlivem infekce *M. pneumoniae* se podílí odpověď imunitního systému. Faktory podílející se na těchto imunitních reakcích zahrnují především indukci Th2 lymfocytů, produkci prozánětlivých cytokinů, imunitních buněk a tvorbu IgE, fyziologické změny jako je bronchiální obstrukce, abiogeneze a otoky (Hong, 2012).

3.3 Extrarespirační infekce

Moderními metodami průkazu *M. pneumoniae* bylo zjištěno, že lze tento mikroorganismus nalézt také v mimoplicních tkáních (Yang et al., 2003). Waites a Talkington (2004) udávají přibližně 25 % osob infikovaných *M. pneumoniae* s extrarespiračními komplikacemi.

Mechanismy zodpovědné za extrapulmonární projevy v důsledku infekce *M. pneumoniae* lze rozdělit do tří kategorií. První kategorie je přímá, v níž hrají hlavní roli cytokiny. Druhou kategorií je typ nepřímý, ve kterém se účastní autoimunitní reakce. Posledním typem je cévní okluze, kde má svůj význam vaskulitida nebo trombóza (Narita, 2010). K extrarespiračním projevům může dojít v souvislosti s respiračním onemocněním, ale není to nutností. Komplikace se objevují zhruba 3 dny po začátku onemocnění a po dobu 2 – 3 týdnů po onemocnění dýchacích cest (Leonardi et al., 2005). Mezi mimoplicní projevy mohou patřit neurologické, kožní, srdeční, hematologické, gastrointestinální a jiné příznaky (Auvichayapat et al., 2006; Guleira et al., 2005; Waites a Talkington, 2004).

Postižení CNS je považováno za nejčastější extrapulmonární projev infekcí *M. pneumoniae* (Smith a Evitar, 2000). *M. pneumoniae* se vyznačuje schopností procházet hematoencefalitickou bariérou. Přibližně u 6 – 7 % hospitalizovaných pacientů s potvrzeným výskytem *M. pneumoniae* dochází k neurologickým komplikacím různé závažnosti (Waites a Talkington, 2004). Kromě přímé invaze *M. pneumoniae* do mozku, se objevilo i podezření na neurotoxické nebo autoimunitní reakce v mozkové tkáni (Koskiniemi, 1993). Postižení CNS zahrnují encefalitidu, cerebrální syndrom, aseptickou meningitidu nebo meningoencefalitidu, akutní diseminovanou encefalomyelitidu, zánět očního nervu, dvojité vidění, duševní zmatek a akutní psychózu (Lin et al., 2002). Waites a Talkington (2004)

považují encefalitidu za nejčastější neurologický projev u dětí. Většina neurologických komplikací se objevuje 1 až 2 týdny po nástupu respiračních příznaků, ale u 20 % a více pacientů nesouvisí vznik neurologických komplikací s infekcí respiračního traktu.

Lee et al. (2006) udává přibližně 25 % pacientů s infekcí *M. pneumoniae*, u kterých se mohou vyskytnout kožní projevy. Kožní onemocnění zahrnuje erytematózní, makulopapulární a vezikulární vyrážky. Příklady kožních onemocnění představují především Stevens-Johnsonův syndrom, erythema multiforme a toxická epidermální nekróza (Lam et al., 2004). Přesný mechanismus poškození kůže a sliznic není známý. Za možné aspekty se považuje buněčná imunitní odpověď, cytotoxické poškození buněk epitelu a autoimunitní mechanismy (Schaloch et al., 2005).

Postižení srdeční svaloviny spojené s infekcí *M. pneumoniae* je relativně vzácné, ale jeho možný výskyt byl zaznamenán u 1 – 8,5 % osob se sérologickým průkazem infekce. Tyto komplikace se vyskytují spíše u dospělých než u dětí (Waites a Talkington, 2004). Byla popsána perikarditida, myokarditida a perikardiální výpotek (Smith a Evitar, 2000). Hemolytické anémie jsou považovány za vzácné, ale závažné komplikace spojené s onemocněním *M. pneumoniae*, vyskytující se častěji u dětí (Waites a Talkington, 2004). Za mechanismus, kterým *M. pneumoniae* způsobuje komplikace, jsou považovány křížově reagující chladové aglutininy (Talkington et al., 2001).

Infekce *M. pneumoniae* mohou být spojeny s řadou nespecifických potíží týkajících se trávicího systému. Mezi ně patří především nevolnost, zvracení a průjem. V souvislosti s *M. pneumoniae* byla zaznamenána i cholestatická hepatitida a pankreatitida (Grulich et al., 2003).

Mezi další možné komplikace může patřit postižení ledvin jako je akutní glomerulonefritida, selhání ledvin, tubulointerstickiální nefritida a IgA nefropatie. *M. pneumoniae* bylo rovněž izolováno z urogenitálního traktu mužů a žen a bylo kultivováno z tubo-ovariálního abscesu (Waites a Talkington, 2004).

4 LÉČBA A PREVENCE

4.1 Citlivost k antimikrobiálním látkám

Absence buněčné stěny činí mykoplasmata rezistentní vůči beta-laktamovým antibiotikům zasahujících do její syntézy. Terapie infekcí vyvolaných *M. pneumoniae* je založena na antibioticích (ATB), působících na úrovni syntézy proteinů nebo nukleových kyselin. Makrolidy, tetracykliny a fluorochinolony efektivně eliminují mykoplasmata jak *in-vivo*, tak *in-vitro* (Korppi, 2003). Fluorochinolony se ukázaly být baktericidní pro *M. pneumoniae*, zatímco makrolidy a tetracykliny jsou primárně bakteriostatické.

Makrolidy jsou obecně považovány za lék první volby pro léčbu infekcí vyvolaných *M. pneumoniae*. Waites a Talkington (2004) uvádí novější látky, jako je clarithromycin nebo azithromycin, za klinicky účinná antibiotika na úrovni erytromycinu. Terapie azithromycinem je vedena po dobu 5 dnů (Suzuki et al., 2006).

Použití tetracyklinů a fluorochinolonů je omezeno jen na dospělé pacienty nebo na pacienty s alergií na makrolidy (Suzuki et al., 2006). Uvedená ATB by neměla být užívána u dětí do 8 let, ačkoliv jsou tyto antibiotika účinná, jsou nevhodná vzhledem k jejich toxicitě. Tetracykliny mohou způsobit depresi růstu kostí, trvalé šedo-hnědé zbarvení zubů a hypoplazii skloviny, pokud jsou podávány v průběhu vývoje zubů. Ačkoli klinický význam fluorochinolonů nebyl prokázán, způsobují erozi chrupavky u mladých zvířat. Proto by tyto látky měly být použity pouze tehdy, když není jiná možnost (Reese a Betts, 2003).

Potenciálním problémem v antimikrobiální léčbě je narůstající rezistence mykoplasmat. Rezistence vůči makrolidům vzniká jako důsledek mutací na 23S RNA (Suzuki et al., 2006).

Tabulka č. 1: Minimální inhibiční koncentrace vybraných antibiotik inhibující 90 % kmenů *M. pneumoniae* publikované různými autory

<i>Antibiotikum</i>	<i>MIC₉₀ [µg/ml]</i>			
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>Tetracyclin</i>			1,0	
<i>Doxycyclin</i>	0,5	0,25	0,5	0,25
<i>Erythromycin</i>			0,004	
<i>Azithromycin</i>	≤0,001	0,00025	≤0,001	0,0005
<i>Clarithromycin</i>	≤0,001	0,004		
<i>Ciprofloxacin</i>	2,0		4	
<i>Levofloxacin</i>	1,0	1,0	1,0	0,5
<i>Moxifloxacin</i>	0,125	0,125	0,125	

- 1 – Waites et al. (2003): bujónová mikrodiluční metoda
 2 – Waites et al. (2005): bujónová mikrodiluční metoda
 3 – Waites et al. (2008): bujónová mikrodiluční metoda
 4 – Waites et al. (2009): bujónová mikrodiluční metoda

4.2 Prevence

V oblasti prevence se věnuje značné úsilí vývoji vakcíny, která by chránila před infekcemi *M. pneumoniae*. Počáteční studie s lidskými dobrovolníky používaly formalínem inaktivované kmeny. Jejich ochranný účinek byl však celkově neuspokojivý (Ellison et al., 1992). Vývoj oslabených živých vakcín podávaných intranazálně nebo při vdechování aerosolu ukázal na zvířecích modelech určitý ochranný účinek, což poukazuje na důležitost stimulace místních slizničních obranných mechanismů (Waites a Talkington, 2004; Yayoshi et al., 1989). Přesto nebyla do dnešního dne žádná vakcína proti *M. pneumoniae* registrována (Waites a Talkington, 2004).

Vzhledem k absenci účinné vakcíny je jedinou možností prevence zamezit kontaktu s nakaženými osobami.

5 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

5.1 Vyšetřovaný materiál

Pro průkaz *M. pneumoniae* se využívá sputum, bronchoalveolární laváž, nasofaryngeální výtěry, pleurální tekutina, popř. perikardiální nebo cerebrospinální tekutina a sérum (Waites et al., 2005).

5.2 Přímá laboratorní diagnostika

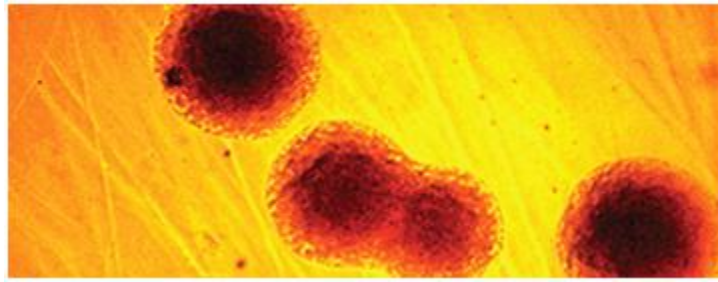
5.2.1 Kultivace a růstové vlastnosti

Kultivace mykoplasmat je velice obtížná. Jedná se o nutričně náročné bakterie, vyžadující pro svůj růst komplexní kultivační půdy. Rostou pomaleji a v drobných koloniích, proto je nutno používat selektivní půdy s přidavkem antibiotik (penicilinu). Některé půdy jsou současně diagnostické, k identifikaci mykoplasmat se používají testy utilizace substrátu (Zámečník et al., 2012; Quinn et al., 1994).

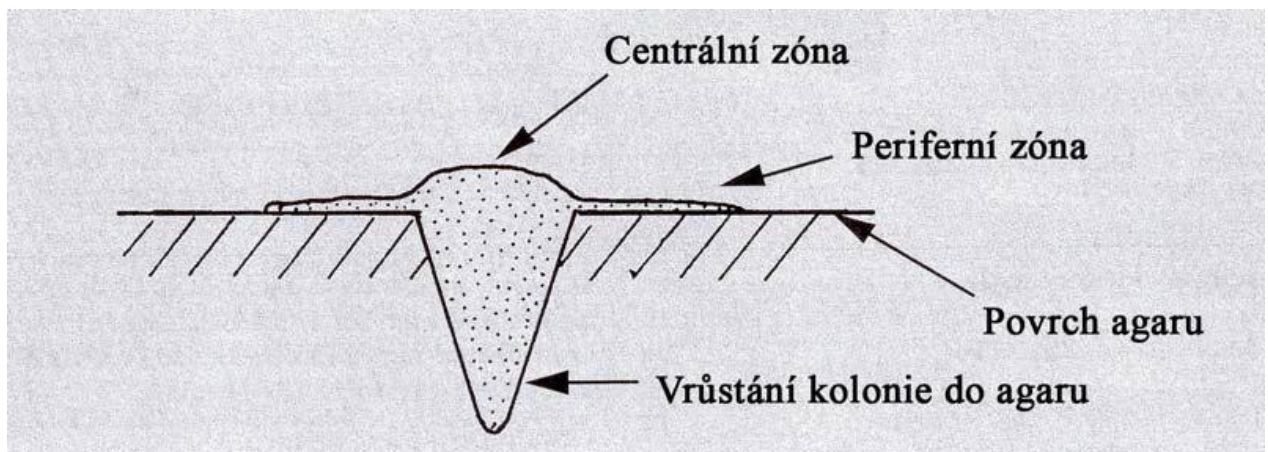
Pro pěstování *M. pneumoniae* se používají PPLO tekuté a agarové půdy. Uvedená média obsahují pepton a mozkosrdcovou infuzi, jež poskytují živiny pro růst, a to dusík, vitamíny, minerály a aminokyseliny. Půdy se dále obohacují o koňské sérum a kvasničný extrakt, které slouží jako zdroj cholesterolu a nukleových kyselin. Do PPLO půd se přidávají inhibitory, potlačující růst nežádoucí mikroflóry. V případě *M. pneumoniae* se využívá zejména penicilin. Pevné půdy navíc obsahují 1 – 1,4 % kvalitního agaru.

Do tekutých PPLO půd se pro hodnocení nárůstu *M. pneumoniae* přidává glukóza a acidobazický indikátor fenolová červeň. Její hydrolýzou dochází k okyselení živného média a změně zbarvení fenolové červně z červené na žlutou, což indikuje přítomnost mikroorganismu. Mimo zkvašování glukózy je dalším diagnostickým znakem redukce tetrazolia na červený formazán.

Inkubace mykoplasmat se provádí při teplotě 37°C v mikroaerofilním prostředí s 5 % CO₂. Nárůst mykoplasmat na pevných půdách se hodnotí pod světelným mikroskopem za 5-7 dní. *M. pneumoniae* vytváří charakteristické kolonie vzhledu „volského oka“, kdy centrální část je tmavší a vrůstá do agaru (Chanock et al. 1962; Quinn et al., 1994).



Obrázek č. 2: Zrnité kolonie *M. pneumoniae* na PPLO agaru (100x zvětšení) (Shankar et al., 2010)



Obrázek č. 3: Průřez kolonií mykoplasm (Quinn et al., 1994)

5.2.2 Molekulárně-biologické metody

Moderním trendem v diagnostice infekcí vyvolaných mykoplasmaty je využití molekulárně biologických technik. Jejich výhodou oproti klasickému kultivačnímu vyšetření je jednodušší provedení, vyšší rychlost a spolehlivost. Naopak nevýhodou je přítomnost inhibitorů v klinickém materiálu, které mohou vést k falešně negativním výsledkům. V praxi nejrozšířenějšími jsou zejména metoda hybridizace a polymerázové řetězové reakce (PCR) včetně jejich modifikací.

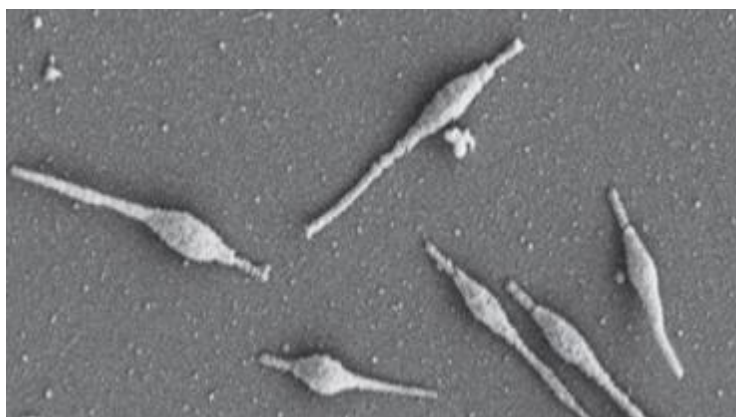
Principem PCR je amplifikace (namnožení) úseku DNA specifického vůči hledanému agens a jeho následná detekce gelovou elektroforézou. Pomocí PCR byla detekována přítomnost *M. pneumoniae* i mimo respirační trakt jako je synoviální tekutina, mozkomíšni mok, perikardiální tekutiny a kožní léze (Bar Meir et al., 2000). Martinez et al. (2008) použili tuto metodu k průkazu *M. pneumoniae* z výplachů krku. Další možností je užití Real-time PCR, jejíž výhodou je možnost kvantifikace infekční nálože. Tuto metodu užíli

Nir-Paz et al. (2012) nebo Pitcher et al. (2006) k detekci oblasti genu proteinu P1 *M. pneumoniae* v klinických vzorcích.

V hybridizaci se využívá sonda (krátký úsek DNA o známé nukleotidové sekvenci), která je značena fluorescenčně nebo radioaktivně. Sonda se váže na testovanou DNA v místě specifické sekvence a to na principu komplementarity (Bártová, 2011).

5.3 Ostatní metody průkazu

Mikroskopicky můžeme vyšetřit odebraný materiál ihned. Díky rozměrům mikroorganismu *M. pneumoniae* se pro jeho mikroskopii používá elektronová mikroskopie. Transmisivní elektronová mikroskopie umožňuje pozorování třívrstevné cytoplazmatické membrány. Selektivní a rychlé je barvení DNA na ultrastrukturální úrovni (Szymanski, 2002).



Obrázek č. 3: Morfologie buněk *M. pneumoniae* v rastrovacím elektronovém mikroskopu (Atkinson et al., 2008)

Specifická identifikace *M. pneumoniae* se provádí pomocí antisér proti různým druhům lidských mykoplasmat. Test inhibice růstu (RIT) je založen na inhibici růstu kultury kolem disku se specifickou protilátkou. Při imunofluorescenčním testu (tzv. epifluorescence) se značená antiséra aplikují na celé kolonie mykoplasmat.

V diagnostice *M. pneumoniae* se uplatňují i metody nepřímé diagnostiky, založené na průkazu specifických protilátek. V praxi jsou k jejich stanovení rutinně používány metody ELISA nebo komplement-fixační reakce (KFR). Velký význam v nepřímé diagnostice má sledování dynamiky tvorby protilátek. K jejímu stanovení se vyšetřují tzv. párová séra. Jedná se o minimálně dva vzorky sér, kdy mezi jednotlivými odběry je alespoň 10 denní odstup. Pozitivita protilátek třídy IgG, IgA, a IgM svědčí o tom, že se pacient se zmíněným infekčním

agens setkal. V KFR testu se titr protilátek 1:64 pokládá za podezřelý, za pozitivní výsledek lze považovat titr 1:128. Metoda KFR je méně citlivá metoda stanovení protilátek ve srovnání s ELISA, ukázala se však velmi užitečná pro sledování dynamiky tvorby protilátek (Raszka et al., 2012).

ELISA-VIDITEST anti-Mycoplasma pneumoniae jsou komerčně dodávané soupravy určené pro laboratorní diagnostiku infekcí vyvolaných *M. pneumoniae*. Test se využívá zejména pro diagnostiku všech druhů zánětů dýchacích cest od lehkých katarů až po těžké pneumonie, včetně komplikací jako perikarditida, meningoencefalitida nebo erythema nodosum (VIDIA spol. s r.o., 2012).

Séra se dají dále vyšetřovat imunofluorescenční metodou za užití monoklonální protilátky značené fluoresceinem. Je tu však vysoké procento falešně negativních výsledků.

Rovněž je možný průkaz antigenu *M. pneumoniae* ve sputu nebo v aspirovaných sekretech z nosohltanu, monoklonálními protilátkami značenými fluorescenčním barvivem, případně enzymatickou imunoanalýzou (EIA).

Imunoblotting se používá jako konfirmační sérologická metoda a není běžně dostupný v rutinních laboratořích (Sánchez-Vargas a Gómez-Duarte, 2007).

6 ZÁVĚR

V bakalářské práci jsme věnovali pozornost *M. pneumoniae*. Jedná se o patogenní mikroorganismus, který je častým původcem infekcí respiračního traktu u lidí. *M. pneumoniae* patří do skupiny unikátních bakterií, souhrnně označovaných jako mykoplasmata. Uvedené mikroorganismy představují nejmenší samostatně se replikující prokaryota schopné růstu na bezbuněčných médiích. Rozsáhlými studiemi bylo zjištěno, že se mykoplasmata vyznačují velmi malým genomem, který souvisí s jejich parazitickým způsobem života.

M. pneumoniae je významné etiologické agens respiračních infekcí u člověka, postihující především děti a osoby staršího věku. Onemocnění se nejčastěji manifestují jako infekce horních cest dýchacích, které mohou vyústit v závažné pneumonie. Rizikem infekcí *M. pneumoniae* může být postižení i dalších orgánů mimo respirační trakt. Nejčastěji bývá postižena zejména centrální nervová soustava nebo srdeční sval. Vzácně se mohou objevit postižení ledvin, kožní projevy nebo střevní potíže.

Léky první volby v terapii infekcí vyvolaných *M. pneumoniae* jsou makrolidová antibiotika. V současnosti se objevují stále častěji zprávy o zvyšující se odolnosti *M. pneumoniae* vůči jejich působení. Vhodnou alternativu k makrolidům mohou představovat fluorochinolony nebo tetracykliny. Nevýhodou fluorochinolonových antibiotik je jejich vyšší toxicita. Proto je jejich aplikace indikována především v komplikovaných případech nebo při alergii na makrolidy.

V diagnostice *M. pneumoniae* se využívají metody přímé i nepřímé detekce. Z přímých metod je dodnes za zlatý standard považováno kultivační vyšetření na PPLO půdách. Vzhledem k náročnosti kultivace byly zavedeny i molekulárně biologické metody, jejichž výhodou je vedle jednoduššího provedení i vyšší citlivost a spolehlivost. V nepřímé diagnostice se prokazují specifické protilátky metodami ELISA nebo KFR.

7 SEZNAM LITERATURY

ATKINSON, T. P., BALISH, M. F. WAITES, K. B. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiology Reviews*. 2008, roč. 32, č. 6. ISSN 0168-6445.

AUVICHAYAPAT, N. a P., WATANATORN, J., THAMAROJ, J., JITPIMOLMARD, S. Kluver-Bucy syndrome after mycoplasmal bronchitis. *Epilepsy & Behavior*. 2006, roč. 8, č. 1, s. 320-322. ISSN 15255050.

BALISH, M. F. a KRAUSE, D. C. Cytadherence and the cytoskeleton. In S. Razin and R. Herrman (ed.), Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Kluwer Academic/Plenum Publishers, N. Y.* 2002, roč. 62, č. 4, s. 491-518.

BAR MEIR, E., AMITAL, H., LEVY, Y., KNELLER, A., BAR-DAYAN, Y., SHOENFELD, Y. *Mycoplasma-pneumoniae*-induced thrombotic thrombocytopenic purpura. *Acta Haematologica*. 2000, roč. 103, č. 2, s. 112-115. ISSN 1421-9662.

BÁRTOVÁ, E. Southern blotting a hybridizace. *Molekulární biologie: VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat*. 2011.

BLOCK S., HEDRICK, J., HAMMERSCHLAG, M. R., CESSSELL, G. H., CRAFT, J. C. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in pediatric community-acquired pneumonia: comparative efficacy and safety of clarithromycin vs. erythromycin ethylsuccinate. *The Pediatric Infectious Disease*. 1995, roč. 14, č. 6, s. 471-477.

BROADERS, S. A., HOOPER, W. C., PHILLIPS, D. J., TALKINGTON, D. F. *Mycoplasma pneumoniae* subtype-independent induction of proinflammatory cytokines in THP-1 cells. *Microbial Pathogenesis* 2006, roč. 40, č. 6, s. 286-292. ISSN 08824010.

CONDA pronadisa: Micro a Molecular Biology. PPLO agar base w/o crystal violet. [online]. 2010. Dostupné z: <http://www.condalab.com/pdf/1140.pdf>. [citováno 2012-05-11].

DANDEKAR, T., SNEL, B., SCHMIDT, S., LATHE, W., SUYAMA, M., HUYNEN, M., BORK P. Comparative Genome Analysis of the *Mollicutes*. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. 2002, část 2, s. 255-278.

DAVIS, R. E. Phytoplasma taxonomy. *Agricultural Research Service*. [online]. 2011, dostupné z: http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/pclass/pclass_taxonomy.html. [citováno 2012-03-11].

DIENES, L. a EDSALL G. Observation on the L-organisms of Klieneberger. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1937, roč. 36, s. 740-744.

DRASBEK, M., CHRISTIANSEN, G., DRASBEK, K. R., HOLM, A., BIRKELUND, S. Interaction between the P1 protein of *Mycoplasma pneumoniae* and receptors on HEp-2 cells. *Microbiology*. 2007, roč. 153, č. 11, s. 3791-3799. ISSN 1350-0872.

EATON, M. D., MEIKLEJOHN, G., VAN HERICK, W. Studies on the etiology of primary atypical pneumonia: A filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters, and chick embryos. *The Journal of Experimental Medicine* 1944, roč. 79, č. 6, s. 649-667. ISSN 0022-1007.

ELLISON, J. S, OLSON, L. D., BARILE, M. F. Immunity and vaccine development. In J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch, and J. B. Baseman (ed.), *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. *American Society for Microbiology, Washington, D. C.* 1992, s. 491-504.

ESPOSITO, S., DROGHETTI, R., BOSIS, S., CLAUT, L., MARCHISIO, P., PRINCIPI, N. Cytokine secretion in children with acute *Mycoplasma pneumoniae* infection and wheeze. *Pediatric Pulmonology*. 2002, roč. 34, č. 2, s. 122-127. ISSN 8755-6863.

FERWERDA, A., MOLL, H. A., GROOT R. Respiratory tract infections by *Mycoplasma pneumoniae* in children: a review of diagnostic and therapeutic measures. *European Journal of Pediatrics* 2001, roč. 160, č. 8, s. 483-491. ISSN 0340-6199.

GRULLICH, C., BAUMERT, T. F., BLUM, H. E. Acute *Mycoplasma pneumoniae* infection presenting as cholestatic hepatitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003, roč. 41, č. 1, s. 514-515. ISSN 1098-660X.

GULEIRA, R., NISAR, N., CHWLA, T. C., BISMAR, N. R. *Mycoplasma pneumoniae* and central nervous system complications: a review. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2005, roč. 146, č. 2, s. 55-63. ISSN 00222143.

HAMES, C., HALBEDEL, S., HOPPERT, M., FREY, J., STULKE J. Glycerol Metabolism Is Important for Cytotoxicity of *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* . 2009, roč. 191, č. 3, s. 747-753. ISSN 0021-9193.

HARDY, R. D., JAFRI, H. S., OLSEN, K., WORDEMANN, M., HATFIELD, J., ROGERS, B. B., PATEL, P., DUFFY, L., CASSELL, G., MCCRACKEN, G. H., RAMILO, O. Elevated Cytokine and Chemokine Levels and Prolonged Pulmonary Airflow Resistance in a Murine *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia Model: a Microbiologic, Histologic, Immunologic, and Respiratory Plethysmographic Profile. *Infection and Immunity*. 2001, roč. 69, č. 6, s. 3869-3876. ISSN 0019-9567.

HAVLÍK, J. Onemocnění způsobená „atypickými mikroby“. *Pediatric pro praxi*. 2009, roč. 10, č. 1, s. 8-10. ISBN 1213-0494.

HIMMELREICH, R., HILBERT, H., PLAGENS, H., PIRKL, E., LI, B. C., HERRMANN, R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*. 1996, roč. 24, č. 22, s. 4420-4449. ISSN 0305-1048.

HONG, S. J. The Role of *Mycoplasma pneumoniae* Infection in Asthma. *Allergy, Asthma and Immunology Research*. 2012, roč. 14, č. 2, s. 59. ISSN 2092-7355.

CHANOCK, R. M., DIENES, L., EATON, M. D., EDWARD, G., FREUNDT, E. A., HAYFLICK, L., HERS, J. F., JENSEN, K. E., LIU, C., MARMION, B. P., MORTON, H. E.,

MUFSON, M. A., SMITH, P. F., SOMERSON, N. L., TAYLOR-ROBINSON, D. *Mycoplasma pneumoniae*: Proposed Nomenclature for Atypical Pneumonia Organism (Eaton Agent). *Science*. 1963, roč. 140, č. 3567, s. 662-662. ISSN 0036-8075.

CHANOCK, R. M., HAYFLICKI, L., BARILE, M. F. Growth on artificial medium of an agent associated with typical pneumonia and its identification as a PPLO. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1962, roč. 48, č. 1, s. 41-49.

CHAUDHRY, R. A., VARSHNEY, K., MALHOTRA, P. Adhesion proteins of *Mycoplasma pneumoniae*. *Front Biosci*. 2007, roč. 12, s. 690-699.

JOHANSSON, K. E. a PETTERSSON, B. Taxonomy of *Mollicutes*. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. Microbiology and Molecular Biology Rewievs*. 2002, část 1, s. 1-29. ISSN 1098-5557.

KATZ, B. a WAITES, K. B. Emerging intracellular bacterial infections. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2004, roč. 24, č. 3, s. 627-649. ISSN 02722712.

KLEMENT, E., TLAKINGTON, D. F., WASSERZUG, O. et al. Identification of risk factors for infection in an outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract disease. *Clinical Infectious Disease*. 2006, roč. 43, č. 10, s. 1239-1245. ISSN 1058-4838.

KORPPI, M. Community-acquired pneumonia in children: issues in optimizing antibacterial treatment. *PubMed*. 2003, roč. 5, č. 12, s. 821-832.

KORPPI M., HEISKANEN-KOSMA T., KLEEMOLA M. Incidence of community-acquired pneumonia in children caused by *Mycoplasma pneumoniae*: serological results of a prospective, population-based study in primary health care. *Respirology*. 2004, roč. 9, s. 109-114. ISSN 1323-7799.

KOSKINIEMI, M. CNS Manifestations Associated with *Mycoplasma pneumoniae* Infections: Summary of Cases at the University of Helsinki and Review. *Clinical Infectious Diseases*. 1993, roč. 17, č. 1, s. 52-57. ISSN 1058-4838.

KRAUSE, D. C. a BALISH, M. F. Structure, function, and assembly of the terminal organelle of *Mycoplasma pneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters*. 2001, roč. 198, č. 1, s. 1-7. ISSN 03781097.

LAM, N. S., YANG, Y. H., WANG, L. C., LIN, Y. T., CHIANG, B. L. Clinical characteristics of childhood erythema multiforme, Stevens–Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Taiwanese children. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 2004, roč. 37, č. 6, s. 366-370.

LEE, K. Y., LEE, H. S., HONG J. H. et al. Role of prednisolone treatment in severe *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. *Pediatric Pulmonology*. 2006, roč. 41, č. 3, s. 263-268. ISSN 8755-6863.

LEONARDI, S., PAVONE, P, ROTOLO, N., LA ROSA, M. Stroke in two children with *Mycoplasma pneumoniae* infection. A casual or causal relationship? *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2005, roč. 24, č. 9, s. 843-844.

LIN, W. C., LEE, P. I., LU, C. Y., HSIEH, Y. C., LAI, H. P., LEE, C. Y., HAUNG, L. M. *Mycoplasma pneumoniae* encephalitis in childhood. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2002, roč. 35, č. 3, s. 173-178.

MACDOWELL, A. L. a BACHARIER, L. B. Infectious triggers of asthma. *Immunology and Allergy Clinics of North America: Asthma Triggers*. 2005, roč. 25, č. 1, s. 45-66. ISSN 08898561.

MARMION, B. P. a GOODBURN, G. M. Effect of an inorganic gold salt on Eaton's primary atypical pneumonia agent and other observations. *Nature*. 1961, roč. 189, s. 247-248.

MARSTON, B. J., PLOUFFE, J. F., FILE, T. M., HACKMAN, B. A., SALSTROM, S. J., LIPMAN, H. B., KOLCZAK, M. S., BREIMAN, R. F. Incidence of Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization: Results of a Population-Based Active Surveillance

Study in Ohio. *Archives of Internal Medicine*. 1997, roč. 157, č. 15, s. 1709-1718. ISSN 0003-9926.

MARTINEZ, M. A., RUIZ M., ZUNINO E., LUCHSINGER V., AVENDANO L. F. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in adult community-acquired pneumonia by PCR and serology. *Journal of Medical Microbiology* 2008, roč. 57, č. 12, s. 1491-1495. ISSN 0022-2615.

MAYER, G. Bacteriology - chapter nineteen: *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. *Microbiology and Immunology On-line* 2010.

MEIKLEJOHN, G., EATON M. D., VAN HERICH, W. A clinical report on cases of primary atypical pneumonia caused by a new virus. *The Journal of Clinical Investigation*. 1945, roč. 24, č. 2, s. 241-250. ISSN 0021-9738.

MELKOVÁ, R. Antigénový profil *Mycoplasma* species a jeho význam pre patogenitu. *Bulletin Československé společnosti mikrobiologické*, 2003, roč. 4, s. 126-137.

MIYATA, M. a OGAKI, H. Cytoskeleton of *Mollicutes*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2006, roč. 11, s. 256-264. ISSN 1660-2412.

NARITA, M. Pathogenesis of extrapulmonary manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infection with special reference to pneumonia. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2010, roč. 16, č. 3, s. 162-169. ISSN 1341-321x.

NIR-PAZ, R., ABUTBUL A., MOSES, A. E. Ongoing epidemic of *Mycoplasma pneumoniae* infection in Jerusalem, Israel, 2010 to 2012. *Eurosurveillance* 2012, roč. 17, č. 8.

NOCARD, E. a ROUX, E. R. Le mikrobe de la peripneumonie. *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)*. 1898, roč. 12, s. 240-262.

PARKER, M. T. a DUERDEN, B. J. *Systematic bacteriology*. Philadelphia: B. C. Decker, 1993. 709 s. ISBN 1-55664-290-3. Kapitola 2.33, The *Mycoplasmatales*, s. 664-681.

PITCHER, D. G. a NICHOLAS, R. A. *Mycoplasma* host specificity: fact or fiction? *The Veterinary Journal* 2005, roč. 170, č. 3, s. 300-306. ISSN 10900233.

PITCHER, D. Real-time detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory samples with an internal processing control. *Journal of Medical Microbiology*. 2006, roč. 55, č. 2, s. 149-155. ISSN 0022-2615.

PORATH, A., SCHLAEFFAR, F., LIEBERMAN, D. The epidemiology of community-acquired pneumonia among hospitalized adults. *Journal of Infection*. 2001, roč. 34, č. 1, s. 41-48. ISSN 01634453.

PORT, T. Primary Atypical Pneumonia. *Microbiology*. [online] 2007. Dostupné z: <http://tami-port.suite101.com/primary-atypical-pneumonia-a32946>. [citováno 2012-02-19]

QUINN, P. J., CARTER, M. E., MARKEY, B. K., CARTER, G. R. *Clinical veterinary microbiology*. Wolfe Publishing, 1994. 684 s. ISBN 0-7234-1711-3. Kapitola 35, The *Mycoplasmas* (Class: *Mollicutes*), s. 320-326.

RASZKA, J., JANUŠKA, J., RULÍŠKOVÁ, H., TOMISOVÁ, D., ZELENÁ, H. Zkušenosti se sérologickou diagnostikou *Mycoplasma pneumoniae*. In: *Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě: Centrum mikrobiologie, parazitologie a imunologie*. 2012.

REESE, R. E. a BETTS, R. F. Tetracyclines. In R. F. Betts, S. W. Chapman, and R. L. Penn (ed.), *A practical approach to infectious diseases, 5th ed.* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa. 2003, s. 1112-1116.

ROTTEM, S. Invasion of mycoplasmas into and fusion with host cells. In S. Razin and R. Herrmann (ed.), *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, N. Y. 2002, s. 391-402.

RUDD, K. E. EcoGene: a genome sequence database for *Escherichia coli* K-12, 2000, roč. 28, č. 1, s. 60-64. ISSN 13624962.

SÁNCHEZ-VARGAS, F. M. a GÓMEZ-DUARTE, O. G. *Mycoplasma pneumoniae*-an emerging extra-pulmonary pathogen. *Clinical Microbiology and Infection*. 2007, roč. 14, č. 2. ISSN 1198-743X.

SHANKAR, E. M., VIGNESH, R., RAO, U. A., PGIBMS, A. Cover image. *Journal of Medical Microbiology*. 2010, roč. 59, č. 6. ISSN 0022-2615.

SCHALOGH, P. C., BRENNICH, J. B., DINULOS, J. G. H. *Mycoplasma pneumoniae* infection associated with bullous erythema multiforme. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2005, roč. 52, č. 4, s. 705-706. ISSN 01909622.

SMITH, R. a EVITAR, L. . Neurologic manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infections: diverse spectrum of diseases. A report of six cases and review of the literature. *Clinical Pediatrics* 2000, roč. 39, č. 4, s. 195-201.

SOMERSON, N. L., WALLS, B:E., CHANOCK, R. M. Hemolysin of *Mycoplasma pneumoniae*: tentative identification as a peroxide. *Science*. 1965, roč. 150, č. 3693, s. 226-228. ISSN 0036-8075.

SUZUKI, S., YAMAZAKI, T., NARITA, M., SUZUKI, I., ANDOH, T., MATSUOKA, M., T. KENRI, T., ARAKAWA, Y., SASAKI, T. Clinical Evaluation of Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006, roč. 50, č. 2, s. 709-712. ISSN 0066-4804.

SZYMANSKI, M., PETRIC, M., SAUDERSEN, F. E., TELLIER, R. *Mycoplasma pneumoniae* Pericarditis Demonstrated by Polymerase Chain Reaction and Electron Microscopy. *Clinical Infectious Disease* 2002, roč. 345, č. 1, s. 16-17. ISSN 1058-4838.

TALKINGTON, D. F., WAITES, K. B., SCHWART, S. B., BESSER, R. E. Emerging from obscurity: understanding pulmonary and extrapulmonary syndromes, pathogenesis, and epidemiology of human *Mycoplasma pneumoniae* infections. In W. M. Scheld, W. A. Craig, and J. M. Hughes (ed.), *Emerging Infections 5*. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 2001, s. 57-84.

TAYLOR-ROBINSON, D., GREENWOOD, D., SLACK, R. C. B., PEUTHERER, J. F. et al. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 1999. 686 s. ISBN 80-7169-365-0. Kapitola 42, s. 389-398.

TORŠOVÁ, V. a MEDKOVÁ, Z. *Mycoplasma Pneumoniae* a *Chlamydia pneumoniae*: Původci respiračních infekcí a jejich vztah k některým chronickým onemocněním. *Interní medicína pro praxi*. 2001.

VIDIA spol. s r. o. *Mycoplasma pneumoniae*. [online] 2012. Dostupné z: http://www.vidia.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=29&Itemid=23&lang=cs. [citováno 2012-03-15]

WAITES, K. B. a TALKINGTON, D. F. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2004, roč. 17, č. 4, s. 697-728. ISSN 0893-8512.

WAITES, K. B., CRABB D. M., DUFFY, L. B. Comparative In Vitro Susceptibilities of Human *Mycoplasmas* and *Ureaplasmas* to a New Investigational Ketolide, CEM-101. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009, roč. 53, č. 5, s. 2139-2141. ISSN 0066-4804.

WAITES, K. B., CRABB, D. M., BING, X., DUFFY, L. B. In Vitro Susceptibilities to and Bactericidal Activities of Garenoxacin (BMS-284756) and Other Antimicrobial Agents against Human *Mycoplasmas* and *Ureaplasmas*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003, roč. 47, č. 1., s. 161-165. ISSN 0066-4804.

WAITES, K. B., CRABB, D. M., DUFFY, L. B. Comparative In Vitro Activities of the Investigational Fluoroquinolone DC-159a and Other Antimicrobial Agents against Human *Mycoplasmas* and *Ureaplasmas*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008, roč. 52, č. 10, s. 3776-3778 ISSN 1098-6596.

WAITES, K. B., KATZ, B., SCHELONKA, R. L. *Mycoplasmas* and *Ureaplasmas* as neonatal pathogens. *Clinical microbiology reviews*. 2005a, roč. 18, č. 4, s. 757- 789. ISSN 1098-6618.

WAITES, K. B., REDDY, N. B., CRABB, D. M., DUFFY, L. B. Comparative In Vitro Activities of Investigational Peptide Deformylase Inhibitor NVP LBM-415 and Other Agents against Human *Mycoplasmas* and *Ureaplasmas*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005b, roč. 49, č. 6, s. 2541-2542. ISSN 1098-6596.

WOJTOWICZ, T. *Mycoplasma pneumoniae*. *BioWeb Home*. [online] 2002. Dostupné z: http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2007/wojtowic_trav/index.html. [citováno 2012-04-04]

YALOVICH, A., TARCHIS, M., ROTEM, S. Internalization and intracellular survival of *Mycoplasma pneumoniae* by non-phagocytic cells. *FEMS Microbiology Letters*. 2004, roč. 233, č. 2, s. 241-246.

YANG, J., HOOPER, W. C., PHILLIPS, D. J., TALKINGTON, D. F. Interleukin-1beta responses to *Mycoplasma pneumoniae* infection are cell-type specific. *Microbial Pathogenesis*. 2003, roč. 34, č. 1, s. 17-25. ISSN 08824010.

YAYOSHI, M. a HAYATSU, E. Protective effects of *Mycoplasma pneumoniae* live vaccine or its hyperimmune serum on the experimental infection in mice. *PubMed*. 1989, roč. 63, č. 7, s. 684-691.

ZÁMEČNÍK, M., STRAKA, L., JABOR, A. *Datový standard MZ ČR - verze 4*. [online] 2012 Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/EZAAB.htm. [citováno 2012-05-23].