

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, u nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu literatury a v práci řádně citovány.

15. 3. 2009 Hradec Králové

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat své školitelce MUDr. Michaelle Svobodové za odborné vedení při mé práci v nemocnici, své vedoucí diplomové práce Mgr. Marcelle Vejsově za převzetí zodpovědnosti při mém sepisování diplomové práce a taky Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové za to, že mi umožnila práci na praktické části této práce.

***Souhrn***

Cíl: Cílem práce bylo zjistit výskyt infekcí způsobených *Mycoplasma pneumoniae* ve východočeském regionu v letech 2005 – 2007.

Soubor pacientů: Séra byly získány od 6965 pacientů ve všech věkových kategoriích léčených ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Séra pacientů byla vyšetřována sérologickou metodou ELISA.

Výsledky: Během tohoto období byla infekce *Mycoplasma pneumoniae* prokázána u 9,3 % pacientů (648/6965). Nejvyšší výskyt onemocnění byl v roce 2006 (11 %). Nebyl pozorován výskyt epidemie. Nejvíce nemocných se vyskytovalo u dětí ve věku 5 – 14 let (46,1 %) a u mladistvých do 25 let věku (31,9 %). Komplikace se vyskytovaly v 13,9 % případů, z toho nejvíce komplikací bylo neurologických (meningitidy a polyneuropatie) a gastrointestinálních (průjemy, dyspepsie a hepatitidy).

Závěr: *Mycoplasma pneumoniae* byla příčinou 9,3 % případů pneumonií, přičemž komplikace se vyskytly u 13,9 % případů nemocných. K léčbě mykoplazmových infekcí se používají zejména makrolidy, jejich alternativou jsou tetracykliny nebo flourochinolony.

## **Abstract**

Objective: The work investigated occurrence of *Mycoplasma pneumoniae* infections in east – Czech region in years 2005 – 2007.

Patients: The sera obtained from 6965 patients in all ages that were cure in hospital in Hradec Kralove. The patients' sera examined by serological method which is called ELISA.

Results: In years 2005 – 2007 9,3 % (648/6965) patients fell ill of a *Mycoplasma pneumoniae* infection. The most occurrence of infection was in year 2006 (11 %). We didn't observe epidemic. Children 5 – 14 years old (46,1 %) and adolescents to 25 years old (31,9 %) were most frequent patients. We observed complications in 13,9 % cases, the most frequent were neurological complications (meningitis and neuropathy) and gastro – intestinal complications (diarrhoea, nausea and hepatitis).

Conclusion: *Mycoplasma pneumoniae* cause 9,3 % of infections. Complications were observed in 13,9 % cases of infection. Macrolide antibiotics are used in treatment of *Mycoplasma pneumoniae* infection; tetracycline and fluoroquinolone antibiotics are alternative to cure.

## 1. **Obsah**

Souhrn	3
Abstract	4
2. Seznam použitých zkratk	7
3. Úvod	8
4. Cíl práce	9
5. Teoretická část	10
5.1. Obecná charakteristika mykoplazmat	10
5.2. Struktura <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	11
5.3. Replikační cyklus	13
5.4. Biologické vlastnosti	14
5.5. Patogenita	14
5.6. Epidemiologie	15
5.7. Klinické manifestace infekce <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	15
5.7.1. Respirační infekce	16
5.8. Léčba mykoplazmových infekcí	16
5.9. Imunologie infekcí <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	17
5.10. Diagnostika mykoplazmových infekcí	18
5.10.1. Přímý průkaz	18
5.10.1.1. Přímá mikroskopie	18
5.10.1.2. Kultivace	18
5.10.2. Nepřímý průkaz (sérologie)	20
6. Praktická část	22
6.1. Použitá metoda	22
6.1.1. Princip stanovení	22
6.1.2. Pracovní postup	23
6.1.3. Interpretace výsledků	25
6.1.4. Diagnostický význam jednotlivých tříd protilátek	26
6.1.5. Omezení testu	27
7. Výsledky	28
8. Diskuze	38

9. Závěr	40
10. Seznam použité literatury	41
11. Seznam obrázků	43
12. Seznam tabulek	
44	
13. Seznam grafů	45

## **2. Seznam použitých zkratek**

CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
EBV	virus Einsteina - Baarové
ELISA	Enzyme – Linked Immuno Sorbent Assay; enzymová imunoanalýza
E. coli	Escherichia coli
HRP	křenová peroxidáza
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	kyselina sírová
IDF	imunodifúzní test
IFT	imunofluorescenční test
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IHT	test nepřímé hemaglutinace
KFR	komplementfixační reakce
MIT	test inhibice metabolismu
PAP	primární atypická pneumonie
PCR	polymerázová řetězová reakce
PPLO	pleuropneumonic – like organism
RIA	radioimunoanalýza
TRIT	test inhibice redukce tetrazolia
UGA	uracil – guaninu - adenosin

### **3. Úvod**

*Mycoplasma pneumoniae* je mikrob, který způsobuje onemocnění horních a dolních cest dýchacích, zejména pak atypickou pneumonii. Úkolem této práce bylo zmonitorování výskytu infekcí způsobených *Mycoplasma pneumoniae* ve východočeském regionu v letech 2005 – 2007.

Předkládaná diplomová práce se v teoretické části zabývá obecnou charakteristikou mykoplazmat a diagnostickými metodami pro stanovení infekcí způsobených *Mycoplasma pneumoniae*. Praktická část se pak zabývá detailním popisem diagnostické metody ELISA a zjištěnými výsledky.



#### **4. Cíl práce**

V teoretické části popsat vlastnosti mykoplazmat, podat informace o infekcích, které může *Mycoplasma pneumoniae* způsobit, a popsat metody, kterými lze prokázat infekce způsobené *Mycoplasma pneumoniae*.

Pro zpracování experimentální části byly zadány následující úkoly:

1. Prokázat praktické dovednosti – zvládnout používanou metodiku.
2. Statistické zpracování dat.
3. Samotné sepsání a formulování závěrů vyplývajících z dané práce.

## 5. Teoretická část

### 5.1. Obecná charakteristika mykoplazmat

*Mycoplasma pneumoniae* patří díky absenci rigidní buněčné stěny do třídy *Mollicutes* (lat. *mollis* = měkký, *cutis* = kůže). Třída zahrnuje čtyři řády, přičemž *M. pneumoniae* patří do řádu *Mycoplasmales*, čeledi *Mycoplasmataceae*.

Mykoplazmata jsou nejmenší prokaryotní organismy (6). Pro svůj růst vyžadují přítomnost cholesterolu a většinou i zvýšenou tenzi CO<sub>2</sub> v atmosféře (16). Od ostatních bakterií se odlišují tím, že netvoří peptidoglykan a pevnou buněčnou stěnu (2). Jednotlivé buňky jsou obalené pouze třívrstevnou membránou tvořenou lipidy, proteiny a cukry. Významnou složkou membrány je cholesterol, který přispívá k osmotické stabilitě membrány (3, 16).

Morfologie mykoplazmat je pestrá. Mohou mít tvar kulovitý, ovoidní, prstencovitý, nebo lze pozorovat i vláknité či korálkovité útvary. Velikost jednotlivých buněk se pohybuje od 0,1 do 0,3 μm, proto jsou také mykoplazmata schopná procházet póry bakteriologických filtrů o průměru nejméně 0,25 μm (16).

Mykoplazmata mají nejmenší genom ze všech bakterií (jen 5 x 10<sup>8</sup> daltonů), který je uložen v jediné molekule dvouvláknité DNA (3, 16).

## 5.2. Struktura *M. pneumoniae*

Jak již bylo řečeno, *M. pneumoniae* se vyznačuje absencí buněčné stěny. Na povrchu buňky se nachází plazmatická membrána, která ohraničuje cytoplazmu, v níž se nachází ribozomy obsahující RNA, a cirkulární dvoušroubovice DNA. Plazmatická membrána je třívrstevná o síle 1-8  $\mu\text{m}$ , složená z 50 – 59 % bílkovin, 32 – 40 % tuků a 0,5 – 2 % sacharidů. Na rozdíl od bakteriálních buněk neobsahuje diaminopimelovou a muramovou kyselinu. Hlavní složkou membrány jsou bílkoviny, které mají strukturální i katalytickou úlohu (14).

V cytoplazmatické membráně jsou lokalizovány nejvýznamnější antigeny. Typově specifické jsou hlavně glykolipidy, determinantní skupiny jsou monosacharidy. Proteiny membrány jsou významné jako antigeny a jako hlavní adhesiny (2). Antiséra obsahující protilátky proti těmto složkám inhibují růst a metabolismus mykoplazmat, deformují tvar buňky a v přítomnosti komplementu vyvolávají lýzu organismu (14).

Plazmatická membrána podmiňuje plasticitu a pleomorfii mykoplazmové buňky. Díky těmto vlastnostem mají buňky schopnost procházet membránovými filtry o průměru pórů 450 nm, které zabraňují v průchodu bakteriím s buněčnou stěnou.

V membráně jsou rovněž přítomny enzymy, které štěpením vhodného substrátu získávají pro buňku zdroj energie. Membrána rovněž zajišťuje aktivní transport cukrů, aminokyselin a iontů nutných pro nitrobuněčnou biosyntézu mykoplazmové buňky (14).

Na povrchu buňky se nachází zvláštní „knoflíkovitá“ organela, kontaktní destička membrány, významná pro adhezi (2). *M. pneumoniae* adheruje na receptory z kyseliny neuraminové. Těsné přilnutí na buňku umožňuje mykoplazmatům vpravit do buňky nukleázy a další enzymy a získat tak pro sebe produkty enzymového štěpení.

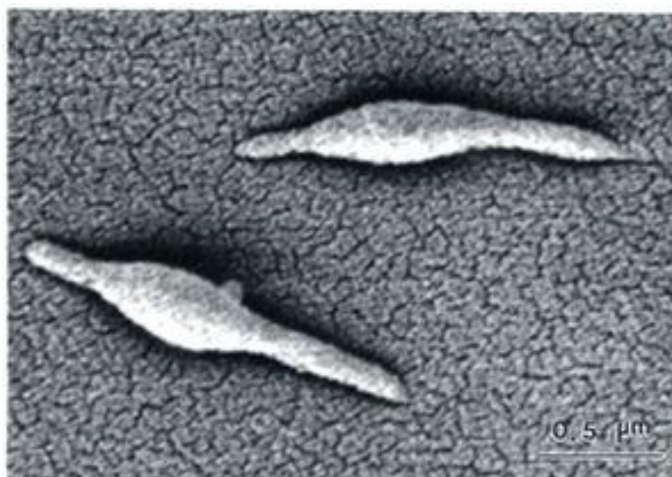
Cytoplazma mykoplazmat neobsahuje endoplazmatické retikulum, jsou v ní ribozomy a rozptýlená nebo centrálně lokalizovaná jaderná substance ve fibrilární formě o síle 3 nm (6). Mykoplazmový genom je tvořen cirkulární dvoušroubovicí DNA, jejíž velikost je  $5 \times 10^8$  daltonů (to odpovídá

1/6 genomu *E. coli*). Obsahuje velmi malé množství guaninu a cytozinu, což ukazuje na omezení genetické informace mykoplazmové buňky. Kodon genomu obsahuje adenin a uracil, přičemž univerzální terminační kodon je UGA. Ribozomální RNA sedimentuje o sedimentačním koeficientu 16S a 22S. RNA-polymeráza je rezistentní na rifampicin (14, 1).

Zdrojem energie pro *M. pneumoniae* je glukóza a jiné metabolizovatelné sacharidy, které tento organizmus štěpí. *M. pneumoniae* vyrůstá na speciálním PPLO agarovém médiu ve formě sférických, homogenně granulárních kolonií, částečně vrostlých do půdy. Některé kolonie mají ztlustělou centrální zónu, která jim dává vzhled sázeného vejce. Velikost kolonií se pohybuje od 50 do 500  $\mu\text{m}$ .

Základním útvarem mykoplazmových kultur je kokovité elementární tělíčko. Průměr nejmenších tělísek schopných reprodukce je 100 – 300 nm. V mykoplazmových kulturách nacházíme také vláknité mnohoaderné buňky, které se mohou rozvětvovat a mají podobu podhoubí (proto mykoplasma). *M. pneumoniae* vytváří na konci vláknitých struktur útvary podobné knoflíku, kterým adhezuje na povrch hostitelské buňky.

Mykoplazmata jsou citlivá k teplu a k vyschnutí, ale přežívají relativně dlouhodobě v aerosolu, kterým se pravděpodobně přenášejí. Jsou odolné ke zmrazení i rozmrazení (14).



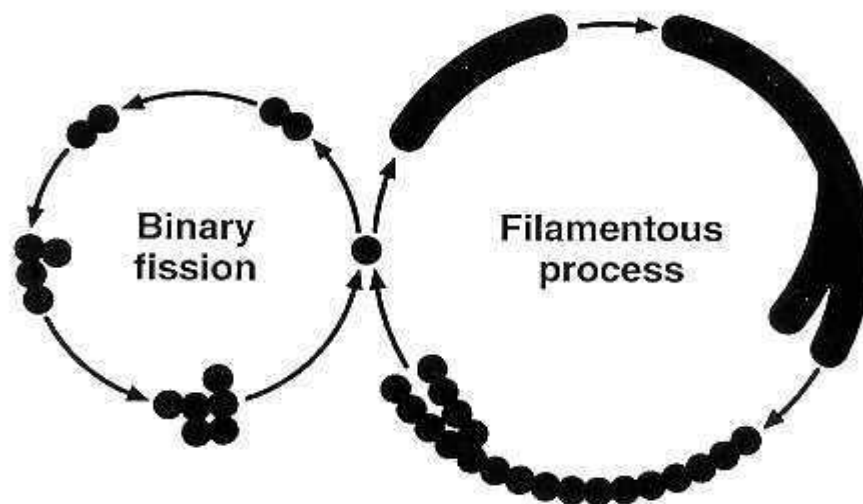
Obrázek 1. Mikroskopická struktura *M. pneumoniae*  
[http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2007/wojtowic\\_trav/](http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2007/wojtowic_trav/)

### 5.3. Replikační cyklus

*M. pneumoniae* se množí binárním dělením. U typického binárního dělení je dělení cytoplazmy synchronizováno s replikací genomu. U *M. pneumoniae* se dělení cytoplazmy může opožďovat za replikací genomu, a proto může docházet k tvorbě mnohojaderných vláken (2, 6, 14). Poté se cytoplazma dělí zaškrcováním membrány v místech mezi dvěma genomy, tvoří se korálkovité řetízky, jež se dále fragmentují, a vznikají jednotlivé koky (6). Ve starší kultuře se tyto volné koky zvětšují a vytvářejí větší elementární tělíska schopná dalšího dělení. Při replikaci se vlákno stahuje, pravděpodobně pomocí kontraktilních proteinů (14). Tento replikační cyklus je podmíněn jak růstovou fází, tak zevními podmínkami (2).

Koky mohou taky pučet, jestliže se mezi dvě dceřiné buňky cytoplazma nerozdělí rovnoměrně.

Nejmenší jednotka mykoplazmat schopná reprodukce je přibližně kulovitá o průměru 200 – 250 nm (6).



Obrázek 2. Rozmnožovací cyklus mykoplazmat. Binární dělení a tvorba mnohojaderných vláken s následným rozpadem na kokoidní tělíska

[http://pdharris.com/chemtrails/mycoplasma\\_from\\_chemtrails.htm](http://pdharris.com/chemtrails/mycoplasma_from_chemtrails.htm)

## 5.4. Biologické vlastnosti

*M. pneumoniae* zkvašuje glukózu, maltózu, dextrin, xylózu, manózu a škrob. Roste za aerobních i za anaerobních podmínek. Má schopnost lyzovat savčí erythrocyty, což je vlastnost, kterou ostatní lidská mykoplazmata nemají. Lyzovány jsou lidské, koňské, morčecí a beraní erythrocyty. Kolonie vyvolávají  $\beta$ -hemolýzu za 24 až 48 hodin.

Funkci antigenů *M. pneumoniae* lze vysvětlit tak, že glykolipidy membrány obsahující glukózu a galaktózu jsou hapteny, jež jsou imunogenní, jen když jsou vázány na bílkoviny membrány. Navozují tvorbu protilátek, které reagují v reakci vazby komplementu a v testu inhibice metabolismu a růstu. Glykolipidy mají náhodně podobnou strukturu s glykolipidy lidského mozku. Zkřížená reakce s protilátkami proti *M. pneumoniae* může mít za následek projevy neurologického postižení při mykoplazmové infekci. Mykoplazmata mohou alterovat antigen na povrchu erythrocytů do té míry, že se proti němu tvoří protilátky (chladové aglutininy), které autoimunitní reakcí poškozují červené krvinky. Imunitní systém hostitele rozpoznává obě hlavní povrchové bílkoviny, jež se uplatňují při adherenci. Jedna z nich je bílkovina P1. Protilátka proti těmto povrchovým antigenům má protektivní povahu a byla prokázána citlivými sérologickými metodami v sérech rekonvalescentů a v sekretech dýchacích cest <sup>(6)</sup>.

## 5.5. Patogenita

Mykoplazmata mají výrazně parazitický způsob života. Parazitují extracelulárně na povrchu membrán infikovaných buněk, ale do nitra buněk nepronikají.

*M. pneumoniae* po vniknutí do dýchacích cest proniká mukociliární vrstvou sliznice a pevně adhezuje na povrch epitelových buněk <sup>(2)</sup>. Přítomnost mykoplazmat na epitelových buňkách může pravděpodobně trvat řadu týdnů, aniž by se u napadeného člověka projevil příznaky onemocnění <sup>(16)</sup>. Mediátorem cytoadherence jsou proteiny mykoplazmové membrány. Hlavním

adhesinem je protein P1. Mykoplasma těsně přilne k buňce sliznice pomocí terčkovité kontaktní destičky. Tak je umožněno přímé působení toxických produktů bakterie na buňku a jejich účinek není blokován tkáňovými enzymy. Napadené buňky hostitele jsou parazitem ochuzovány o aminokyseliny a cholesterol (2).

## 5.6. Epidemiologie

Infekce *M. pneumoniae* jsou rozšířeny po celém světě. Vyskytují se většinou endemicky, onemocnění převažuje v mírném klimatickém pásmu v pozdním létě a na začátku podzimu, v několikaročních cyklech vznikají epidemie (obvykle po 4 – 5 letech). Infekce postihují všechny věkové skupiny, ale nejčastěji děti ve věku 5 – 14 let a mladé dospělé do 29 let. První infekce v dětském věku je obvykle bezpříznaková, generuje krátkou sérovou protilátkovou odezvou. Zdrojem nákazy je nemocný člověk, vzácně rekonvalescent (1, 2, 6, 14). Nemocný se stává infekčním záhy po začátku onemocnění při prvních příznacích postižení dýchacích cest a zůstává jím asi po 10 dní. Pak jeho infekčnost rychle klesá, i když původce nákazy lze izolovat i řadu týdnů po odeznění nemoci.

Přenos infekce *M. pneumoniae* vyžaduje úzký a dlouhodobější kontakt (rodina, škola, různé instituce). Pomalé šíření nákazy zřejmě ovlivňují tři faktory: nízká infekčnost původce, nízká manifestnost nákazy a relativně dlouhá inkubační doba. Průměrná inkubační doba je 13 dnů (1, 14).

## 5.7. Klinická manifestace infekce *M. pneumoniae*

Infekce člověka *M. pneumoniae* se projevuje širokým spektrem reakcí od symptomatických infekcí přes lehká onemocnění horních dýchacích cest až po těžké pneumonie. Jsou to tzv. primární atypické pneumonie (PAP). Komplikace infekcí *M. pneumoniae* postihují řadu dalších systémů:

- gastrointestinální (průjem, hepatitida)
- hematopoetický (sekundární anemie)

- dermatologický (multiformní erytém)
- nervový (meningoencefalitidy, poruchy motorických nervů apod.)
- kardiovaskulární (myokarditidy, perikarditidy apod.)
- postižení pohybového aparátu (myalgie, artralgie, artritidy apod.) (14, 16).

Vznik většiny komplikací onemocnění způsobených *M. pneumoniae* má imunologický charakter.

Závažný průběh mohou mít mykoplazmové infekce u osob s těžkými poruchami imunity. Zde byly popsány případy úmrtí těchto pacientů i během relativně krátké doby, přičemž nejčastější příčinou smrti byla diseminovaná intravaskulární koagulace (16).

### 5.7.1. Respirační infekce

Projevují se jako mírné onemocnění horních cest dýchacích zahrnující rinofaryngitidu, faryngitidu, často spojenou s lymfadenitidou a tracheitidou. Onemocnění je často provázeno bolestmi hlavy a bolestmi při polykání, malátností, kašlem a zvýšenou teplotou.

Pneumonie vyvolané *M. pneumoniae* mívají pozvolný začátek a vyznačují se mrazením, horečkou, bolestí hlavy, bolestí v krku, malátností a kašlem. Kašel je zpočátku suchý, dráždivý, většinou záchvatovitý, neproduktivní. Po týdnu se objevuje hlenovité sputum. Rýma a ucpaný nos nebývají časté. Příznaky se objevují 1 – 5 dnů před rozvojem plicního zánětu. Onemocnění většinou odezní spontánně i bez léčení, ovšem relapsy jsou pro toto onemocnění typické (6, 14).

## 5.8. Léčba mykoplazmových infekcí

Antibiotika zkracují délku onemocnění a snižují vážnost klinického průběhu. Přestože antibiotická terapie zlepší klinický stav pacienta, infekční agens není z respiračního systému eradikováno a jeho vylučování není antibiotiky ovlivněno. Antibiotika se musí nasadit při klinickém podezření co nejdříve, aniž by se vyčkávalo na výsledek laboratorního vyšetření.



Podmínkou úspěšné léčby je podávání antibiotik v obvyklých dávkách nejméně po dobu 10 – 14 dnů, i když klinický stav se může upravit již dříve (6, 14). Mykoplazmata jsou citlivá na antibiotika ze skupiny tetracyklinů (obvykle se užívá doxycylin), moderních makrolidů (azitromycin, klarytromycin), účinná mohou být i některá chemoterapeutika, jako např. fluorované chinolony (ofloxacin, lépe však chinolony IV. generace) (16).

### **5.9. Imunologie infekcí *M. pneumoniae***

Infekce *M. pneumoniae* vyvolává tvorbu různých druhů protilátek. Komplementfixační protilátky mají charakter protilátek třídy IgG a IgM. Po infekci nastává vzestup titrů obou těchto imunoglobulinů, jejich poměr se mění v závislosti na intervalu od začátku onemocnění. Dospělí obvykle tvoří větší množství IgG protilátek než děti, specifické IgM protilátky jsou detekovány častěji u mladších pacientů než u starších (14).

## 5.10. Diagnostika mykoplazmových infekcí

Infekce způsobené *M. pneumoniae* prokazujeme buď kultivačně, nebo sérologicky.

### 5.10.1. Přímý průkaz

Vzorky pro kultivaci odebíráme v akutní fázi nemoci, nejpozději do 5 dnů po začátku onemocnění. Pro kultivační vyšetření používáme výtěr z nosohltanu nebo sputum.

#### 5.10.1.1. Přímá mikroskopie

Přímá mikroskopie nepřipadá pro malou velikost a špatnou barvitelnost mykoplazmat v úvahu.

#### 5.10.1.2. Kultivace

Lidská mykoplazmata jsou kultivačně velmi náročné mikroorganizmy<sup>(14)</sup>. Kultivace se provádí jak v půdách tekutých, tak na agarových plotnách. Tekuté půdy obsahují mimo jiné indikátory reagující na rozklad daného substrátu změnou barvy. *M. pneumoniae* roste na půdě s glukózou, kdy způsobuje zežloutnutí původně lososově růžového média.

Kultivace se provádí v mikroaerofilním prostředí při teplotě 37°C. Doba, za kterou se vytvářejí kolonie, je 4-21 dní, přičemž doporučená délka inkubace je 10 dnů.

Kultivační média pro mykoplazmata musí být obohacená. Základem půd pro kultivaci *M. pneumoniae* je obvykle PPLO (pleuropneumonia – like organism) bujon nebo mozkosrdcový bujon doplněný peptonem a kvasničným extraktem. Do kultivačních půd je nutno přidávat antibiotika za účelem potlačení růstu ostatní bakteriální mikroflóry eventuálně přítomné ve vyšetřovaném vzorku. Nejčastěji se doporučuje polymyxin B, některý aminoglykosid a z antimykotik amfotericin B<sup>(14)</sup>.

Naočkovaná agarová média se prohlíží pravidelně v intervalu 2 dnů při zvětšení 30 – 100x. Kolonie lidských mykoplazmat se objevují na agarových médiích jako okrouhlé, konvexní, homogenně granulární útvary velké 10 – 100  $\mu\text{m}$ , částečně vrostlé do agarového média <sup>(14)</sup>.

K identifikaci *M. pneumoniae* lze použít několik spolehlivých testů:

- Test redukce tetrazolia je založen na specifické schopnosti *M. pneumoniae* redukovat bezbarvý tetrazoliumtrifenyl na červený formazan. Provedení testu je jednoduché – povrch půdy s narostlými suspektními koloniemi se přeje 0,21% roztokem 2-(4-jodfenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-fenyltetrazoliumchloridu a nechá se inkubovat 1 hodinu při teplotě 35°C. Kolonie *M. pneumoniae* za tuto dobu zčervenají a po dalších 3 – 4 hodinách zčernají. Tato zkouška je považována za specifičtější než hemadsorpční test.
- Test hemadsorpce spočívá v přelití povrchu agaru s podezřelými koloniemi 0,2 až 0,4% suspenzí propraných morčecích erytrocytů. Po hodinové inkubaci se povrch plotny jemně opláchne sterilním roztokem a prohlíží se při zvětšení 50 – 100x. Použité erytrocyty adsorbují na povrch kolonií *M. pneumoniae* i na agar v jejich bezprostředním okolí.  
Průkaznost testu je nejvyšší u kolonií starých 5 – 7 dní, starší kolonie schopnost hemadsorpce ztrácejí. U všech ostatních druhů mykoplazmat osídlujících respirační trakt je tento test negativní.
- K identifikaci *M. pneumoniae* lze využít i některé specifické sérologické metody. Jednou z nejrychlejších je epifluorescence, kdy je agarová půda se suspektními koloniemi převrstvena specifickým antisérem proti *M. pneumoniae*, na jehož imunoglobulin je navázán fluoresceinizoithiokyanát. Po odstranění nenavázaných značených protilátek opláchnutím se kolonie pozorují pod fluorescenčním mikroskopem. Kolonie *M. pneumoniae* vykazují fluorescenci.
- Test inhibice růstu je metoda, která v současné době přestává být používána zejména pro svoji časovou náročnost. Spočívá v umístění

disku z filtračního papíru napuštěného specifickým antisérem proti *M. pneumoniae* na povrch agarové půdy přelité suspenzí testovaného kmene. Po několikadenní inkubaci se pod mikroskopem hledá zóna inhibice růstu kolem disku způsobená difúzí protilátek do agaru (14).

### 5.10.2. Nepřímý průkaz (sérologie)

Pro sérologickou diagnostiku infekcí *M. pneumoniae* lze použít řady specifických testů s různým stupněm citlivosti a technické náročnosti. Ve všech sérologických testech hodnotíme dynamiku titrů protilátek v průběhu onemocnění. Jako pozitivní průkaz infekce *M. pneumoniae* označujeme nejméně čtyřnásobný vzestup titru protilátek v akutním a rekonvalescentním séru pacienta (14). Výsledek vyšetření na přítomnost protilátek proti *M. pneumoniae* v séru pacienta je vždy nutno konfrontovat s klinickými příznaky onemocnění.

K nejběžněji používaným sérologickým reakcím patří reakce vazby komplementu (KFR). Jako antigen zde funguje glykolipid *M. pneumoniae*, extrahovaný pomocí chloroform-methanolu. Časový odstup mezi oběma odběry séra by měl být 3 týdny. Při vyšetření jednoho vzorku séra dávají titry 128 a více důvod k podezření na akutní infekci. Hladina komplementfixačních protilátek začíná stoupat asi 7 – 10 dní po začátku infekce a vrcholí ve 4. – 6. týdnu.

Daleko citlivější je reakce ELISA, kde je jako antigen používán purifikovaný adhesin *M. pneumoniae*, obsahující imunodominantní epitopy. Ovšem je nutno mít na zřeteli možnost falešně pozitivních výsledků v důsledku zkřížených reakcí.

Nespecifickým testem je průkaz chladových aglutininů. Tyto protilátky v séru pacientů s mykoplazmovou infekcí reagují za nízkých teplot s lidskými erytrocyty. Od tohoto testu je ovšem upouštěno, protože je méně citlivý a vyžaduje, aby vzorek krve na průkaz chladových aglutininů byl do laboratoře dopraven teplý.

Mezi další testy patří genetická sonda a polymerázová řetězová

reakce (PCR), které umožňují detekci fragmentů nukleových kyselin *M. pneumoniae* ve vzorku již během několika hodin. Jinou možností je technika imunoblotu používající monoklonální protilátky proti 43-kd membránovému adhesinu *M. pneumoniae*. Tato metoda umožňuje detekci mikroba již po 2 dnech inkubace.

Přehled sérologických metod viz. tabulka 1 (14).

Tabulka 1. Testy pro sérologickou diagnostiku *M. pneumoniae*

Druh testu	Citlivost	Specifita	Rychlost provedení	Použití
Komplementfixační reakce (KFR)	vysoká	vysoká	18 – 24 hodin	Široce používaný test především pro diagnostiku akutních onemocnění
Test inhibice metabolismu (MIT)	vysoká	vysoká	6 – 10 dní	Test používaný pro detekci protilátek (protekčních), pro časovou náročnost nevhodný k diagnostickým účelům
Test inhibice redukce tetrazolia (TRIT)	vysoká	vysoká	6 – 10 dní	Test používaný pro detekci protilátek (protekčních), pro časovou náročnost nevhodný k diagnostickým účelům
Imunofluorescenční test (IFT)	vysoká	vysoká	2 – 4 hodiny	Přímá i nepřímá metoda se používá hlavně pro identifikaci izolovaných kmenů, pro detekci protilátek méně vhodný
Imunodifúzní test (IDF)	středně vysoká	vysoká	24 hodin	Test používaný ke studiu antigenních vztahů izolovaných kmenů
Test nepřímé hemaglutinace (IHT)	vysoká	středně vysoká	2 – 4 hodiny	Vzhledem k časové náročnosti přípravy antigenu test méně používaný pro diagnostické účely
Radioimunoanalýza (RIA)	velmi vysoká	vysoká	48 – 72 hodin	Vysoce citlivý test, pro diagnostickou praxi použitelný na specializovaných pracovištích
Enzymová imunoanalýza (ELISA)	velmi vysoká	vysoká	48 – 72 hodin	Vysoce citlivý test, pro diagnostickou praxi použitelný na specializovaných pracovištích
Titrace chladových aglutininů	nízká	nespecifický	2 – 4 hodiny	Jako nespecifický test se v současné době pro diagnostické účely nedoporučuje

## 6. Praktická část

### 6.1. Použitá metoda

Během své práce v nemocnici jsem pro stanovení infekcí způsobených *M. pneumoniae* používala metodu ELISA. K vyšetření jsem používala séra pacientů. Během své práce jsem stanovovala hladiny IgM a IgG protilátek.



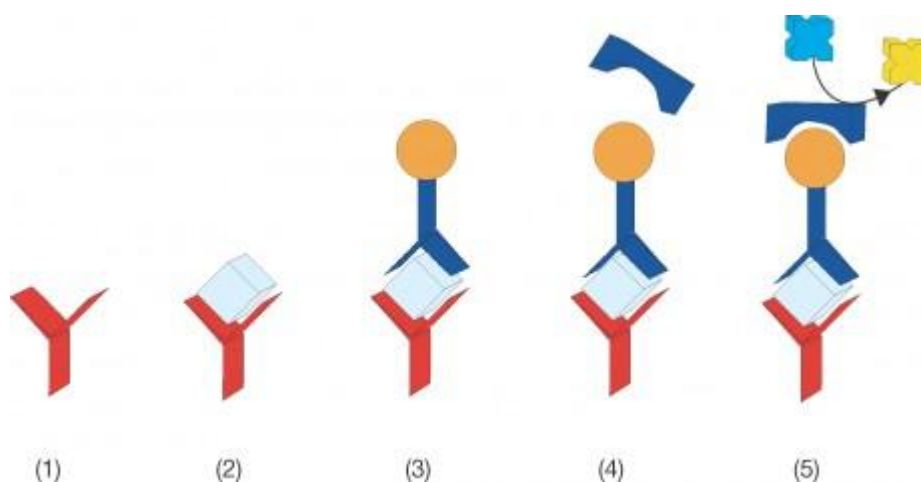
Obrázek 3. Diagnostický komplet metody ELISA; Institut Virion\Serion s.r.o., Serion Immundiagnostica s.r.o., Německo

<http://www.virion-serion.de/36.0.html>

#### 6.1.1. Princip stanovení

Mikrotitrační destička je předplněná čištěnou frakcí membránových

proteinů *M. pneumoniae*. Naředěné testované sérum se inkubuje v jamkách mikrotitrační destičky. Specifická protilátka přítomná v séru pacienta se naváže na antigen navázaný na dně mikrotitrační destičky. Nespecifické protilátky jsou odstraněny promytím. Dále se přidává anti-lidská IgG protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP). Jestliže v prvním kroku vznikl komplex antigen – protilátka, HRP značená protilátka se naváže na protilátku a vytvoří komplex. Nenavázaný konjugát je odstraněn promytím. V dalším kroku je do jamek přidáván chromogenní substrát, který při pozitivní enzymatické reakci vytvoří modré zbarvení. Enzymatická reakce je ukončena stop roztokem (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Modré zbarvení se změní na žluté. Absorbance se měří při 450/620 nm. Hodnota absorbance je proporcionálně úměrná hladině specifických protilátek navázaných na antigeny.



Obrázek 4. ELISA pro detekci IgM specifických protilátek. (1) Mikrotitrační destička s navázanou protilátkou. (2) Po přidání lidského séra dojde k navázání antigenu na protilátku. (3) Přidání anti-lidské IgM protilátky konjugované s křenovou peroxidázou a vytvoření komplexu. (4) Přidání chromogenního substrátu a vytvoření modrého zbarvení. (5) Přidání stop roztoku a změna zbarvení na žluté.

<http://www.bendermedsystems.com/elisa--22>

### 6.1.2. Pracovní postup

Všechny testovací reagentie a vzorky se před použitím vytemperují na laboratorní teplotu. Před použitím se dobře promíchají kalibrátory (P10, P50, P100), negativní kontrola, pozitivní kontrola a testované vzorky sér.

Poté se určí celkové množství jamek potřebných na testování. Kromě vzorků pacienta musí být v každém měření zahrnuta jedna jamka pro blank, jedna pro negativní kontrolu, jedna pro pozitivní kontrolu a tři jamky pro kalibrátory (P10, P50, P100). Po vyjmutí destičky z obalu se odebere potřebné množství stripů odpovídající množství testovaných vzorků. Koncentrovaný promývací pufr se zředí deionizovanou nebo destilovanou vodou (1:20).

Poté se naředí vzorky pacientů v poměru 1:105 následujícím způsobem: k 200  $\mu$ l roztoku pro ředění sér přidáme 10  $\mu$ l séra pacienta (1:21). Následně se přidá 25  $\mu$ l takto získaného roztoku 1:21 ke 100  $\mu$ l roztoku k ředění sér. Poté se pipetuje 50  $\mu$ l blanku (roztok k ředění sér), 50  $\mu$ l negativní kontroly, 50  $\mu$ l pozitivní kontroly, 50  $\mu$ l kalibrátorů (P10, P50, P100) a 50  $\mu$ l sér naředěných v poměru 1:105 do příslušných jamek stripu. Strip se přikryje víčkem a dá se inkubovat na 1 hodinu do vlhké komůrky (37°C). Poté se odstraní přebytečná tekutina z jamek a každá se naplní promývacím pufrům (300 – 350  $\mu$ l) po okraj, tekutina se odstraní. Postup promývání se opakuje třikrát. Stripy a rámeček se osuší jemným poklepáním na absorpčním papíru.

Koncentrovaný roztok HRP-konjugátu IgG se zředí na pracovní koncentraci těsně před použitím v poměru 1:300 roztokem Conjugate Diluent. Do každé jamky se odpipetuje 50  $\mu$ l zředěného konjugátu, strip se přikryje víčkem a inkubuje 1 hodinu při 37°C ve vlhké komůrce. Poté se odstraní přebytečná tekutina z jamek, třikrát se promyje promývacím pufrům a osuší stejným způsobem jako v předchozím případě.

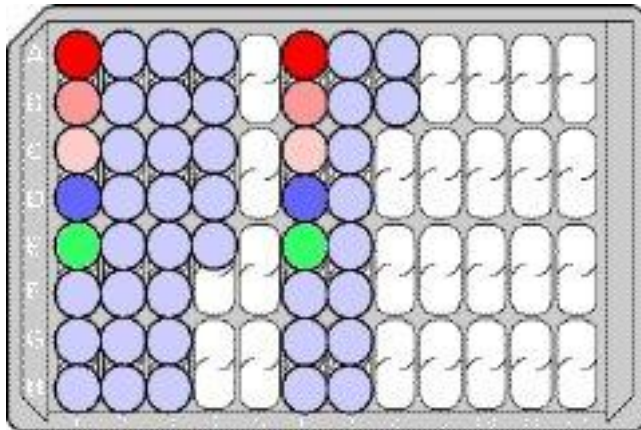
Do každé z jamek se odpipetuje 100  $\mu$ l roztoku TMB-substrátu, přikryje víčkem a inkubuje při laboratorní teplotě 15 minut. Reakce se ukončí přidáním 100  $\mu$ l roztoku Stop roztoku (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). do každé z jamek.

Nakonec se změří absorbance při 450/620 nm a výsledek se zapíše. Odečtení může být provedeno do 30 minut od zastavení chromogenní reakce. Jamky nesmí obsahovat před odečtením žádné bublinky.

Výsledky se poté zadají do počítače, který vypočítá množství IgG v BU/ml.



### 6.1.3. Interpretace výsledků



Obrázek 5. Mikrotitrační destička s výsledným zbarvením.

<http://www.dynex.cz/euroimmun-i>

Tabulka 2. Interpretace výsledků

IgG BU/ml	Výsledek	Diagnostická interpretace
< 10	negativní nedetekovatelná hladina IgG protilátek	Neindikuje infekci <i>M. pneumoniae</i>
≥ 10 ≤ 20	hraniční	Po 2 – 4 týdnech by se měl odebrat 2. vzorek a testovat paralelně s 1. Pokud je i 2. vzorek hraniční, vzorek se považuje za negativní
> 20	pozitivní významná hladina IgG protilátek	Indikuje probíhající nebo nedávnou infekci <i>M. pneumoniae</i>

K získání kompletního protilátkového profilu by mělo být testováno IgA, IgM a IgG.

Tabulka 3. Hladina protilátek proti *M. pneumoniae*

IgG	IgM	IgA	Diagnostická interpretace
negativní	negativní	negativní	Neindikuje infekci <i>M. pneumoniae</i>
negativní nebo pozitivní	pozitivní	negativní nebo pozitivní	Indikuje probíhající infekci <i>M. pneumoniae</i>
pozitivní	negativní	negativní	Indikuje minulou nebo probíhající infekci <i>M. pneumoniae</i>
negativní nebo pozitivní	negativní	pozitivní	Indikuje probíhající infekci nebo reinfekci <i>M. pneumoniae</i>

Zkřížená reaktivita se může vyskytovat u hospitalizovaných pacientů infikovaných respiračními patogeny jako je *Chlamydia pneumoniae*, *Influenza A.*, *Influenza B.*, *Parainfluenza 1, 2 a 3* stejně jako *Adenovirus* a EBV (11).

#### 6.1.4. Diagnostický význam jednotlivých tříd protilátek

Při primoinfekci dochází k vzestupu protilátek třídy IgM 1. – 2. týden po infekci, maxima dosahují přibližně 1 měsíc od začátku onemocnění a mohou perzistovat více než 1 rok. Výskyt specifických IgM protilátek u pacientů do 20 let je 80 %, a pacientů nad 20 let je 40 %. Při reinfekcích zpravidla nedochází k jejich vzestupu.

K vzestupu protilátek třídy IgA dochází obvykle později než u IgM, častý je jejich časnější pokles. Význam mají zejména v případě absence IgM u některých pacientů a dále u reinfekcí.

K vzestupu protilátek třídy IgG dochází někdy už po 2. – 3. týdnu od začátku výskytu příznaků, maximálních hladin dosahují za delší dobu, někdy až za 6 měsíců, perzistují déle než 1 rok, jsou známy případy perzistence déle než 4 roky. V případě reinfekcí je nutno hodnotit dynamiku protilátek u

párových vzorků, odebraných s odstupem 1 – 2 týdny <sup>(5)</sup>.

### **6.1.5. Omezení testu**

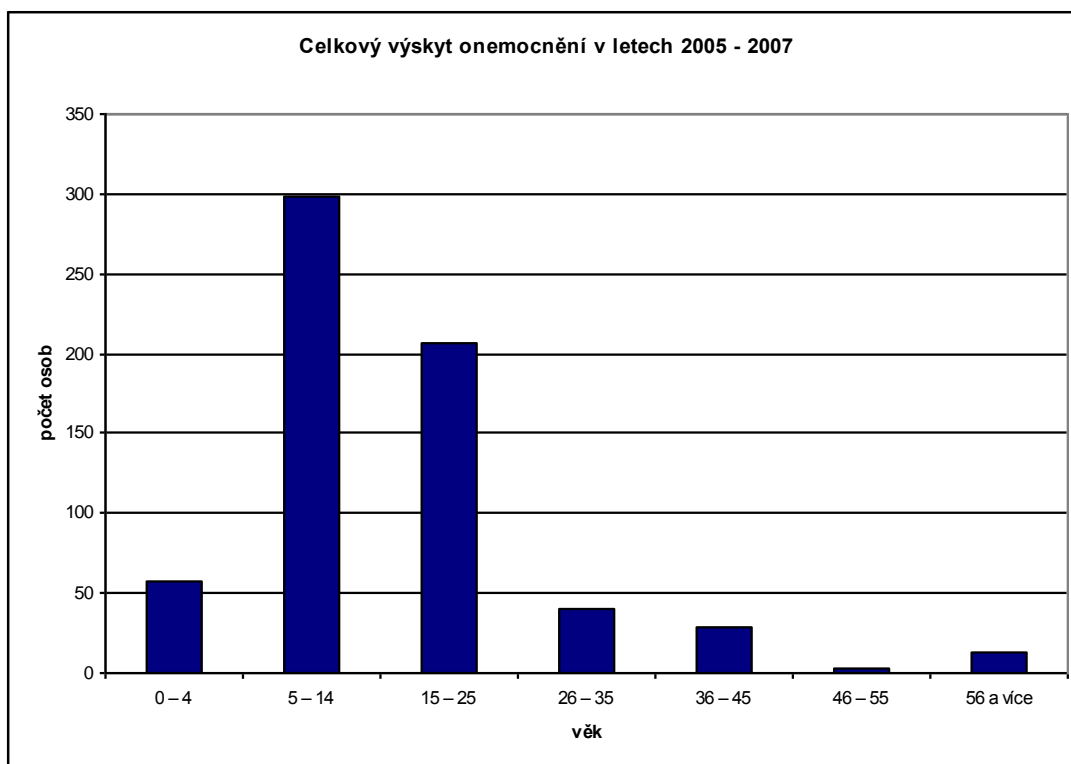
Jednotlivé sérologické testy nemohou být používány jako jediné kritérium pro stanovení diagnózy. Musí se brát v úvahu všechny klinické a laboratorní výsledky.

Vzorky, které byly odebrány příliš brzy během primární infekce nemusí obsahovat detekovatelné množství protilátek. Pokud je podezření na mykoplazmovou infekci, měl by se během 2 – 4 týdnů odebrat další vzorek na analýzu. Ten by se měl testovat paralelně s 1. vzorkem <sup>(11)</sup>.

## 7. Výsledky

Tabulka 4. Výskyt infekcí způsobených *M. pneumoniae* v letech 2005 - 2007

věk	celk. výskyt	%
0 – 4	58	8,9
5 – 14	299	46,1
15 – 25	207	31,9
26 – 35	40	6,2
36 – 45	28	4,3
46 – 55	3	0,5
56 a více	13	2,1
	648	

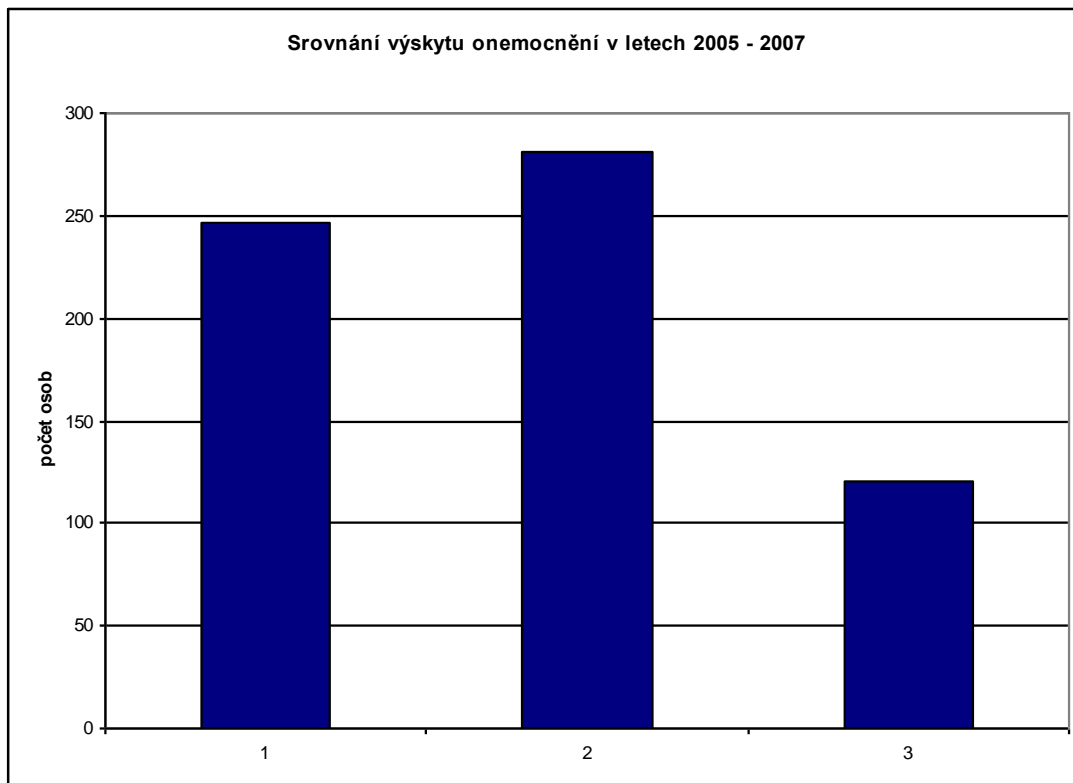


Graf 1. Výskyt infekcí způsobených *M. pneumoniae* v letech 2005 - 2007

Za celé pozorované období zjišťujeme, že ve věkové skupině 5 - 14 let bylo nakaženo infekcí *M. pneumoniae* 299 osob (46,1 %) a ve skupině 15 – 25 let 207 osob (31,9 %). Za toto období byly infekcí *M. pneumoniae* ve skupině 46 – 55 let nakaženy 3 osoby (0.5%).

Tabulka 5. Srovnání výskytu infekcí způsobených *M. pneumoniae* v letech 2005 - 2007

rok	výskyt	počet pacientů	%
2007	246	2754	8,9
2006	281	2558	11
2005	121	1652	7,3
	648	6964	9,3

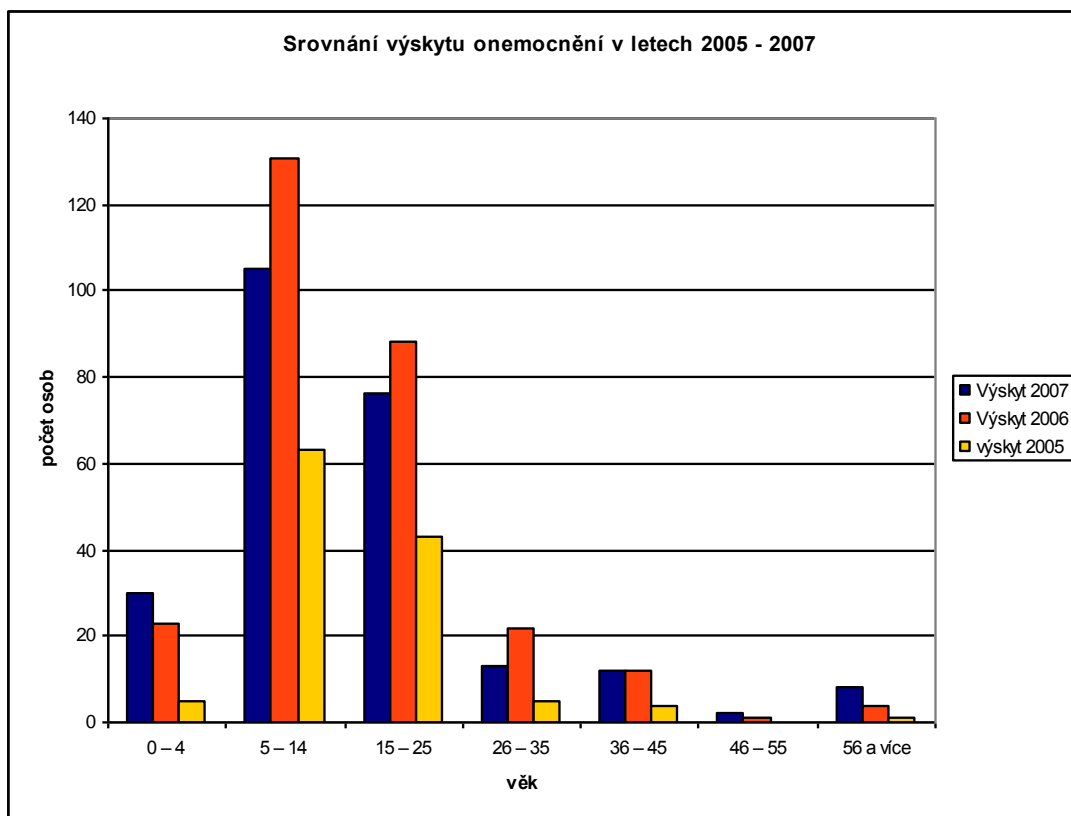


Graf 2. Srovnání výskytu infekcí způsobených *M. pneumoniae* v letech 2005 - 2007

Za pozorované období onemocnělo infekcí *M. pneumoniae* nejvíce osob v roce 2006 (11 % z celkového počtu pacientů). Nejméně osob bylo infikovaných v roce 2005 (7,3 %). Za celé pozorované období nebyla zaznamenána žádná epidemie.

Tabulka 6. Srovnání výskytu infekcí způsobených *M. pneumoniae* v letech 2005 - 2007

věk	Výskyt 2007	Výskyt 2006	výskyt 2005
0 – 4	30	23	5
5 – 14	105	131	63
15 – 25	76	88	43
26 – 35	13	22	5
36 – 45	12	12	4
46 – 55	2	1	0
56 a více	8	4	1



Graf 3. Srovnání výskytu infekcí způsobených *M. pneumoniae* v letech 2005 - 2007

V letech 2005 – 2007 pozorujeme nejvyšší výskyt nemocných v roce 2006, a to ve věkové skupině 5 – 14 let (131 pacientů). Rovněž pozorujeme, že ve věkové skupině 46 – 55 let nebyl v roce 2005 zaznamenán žádný případ infekce způsobené *M. pneumoniae*.

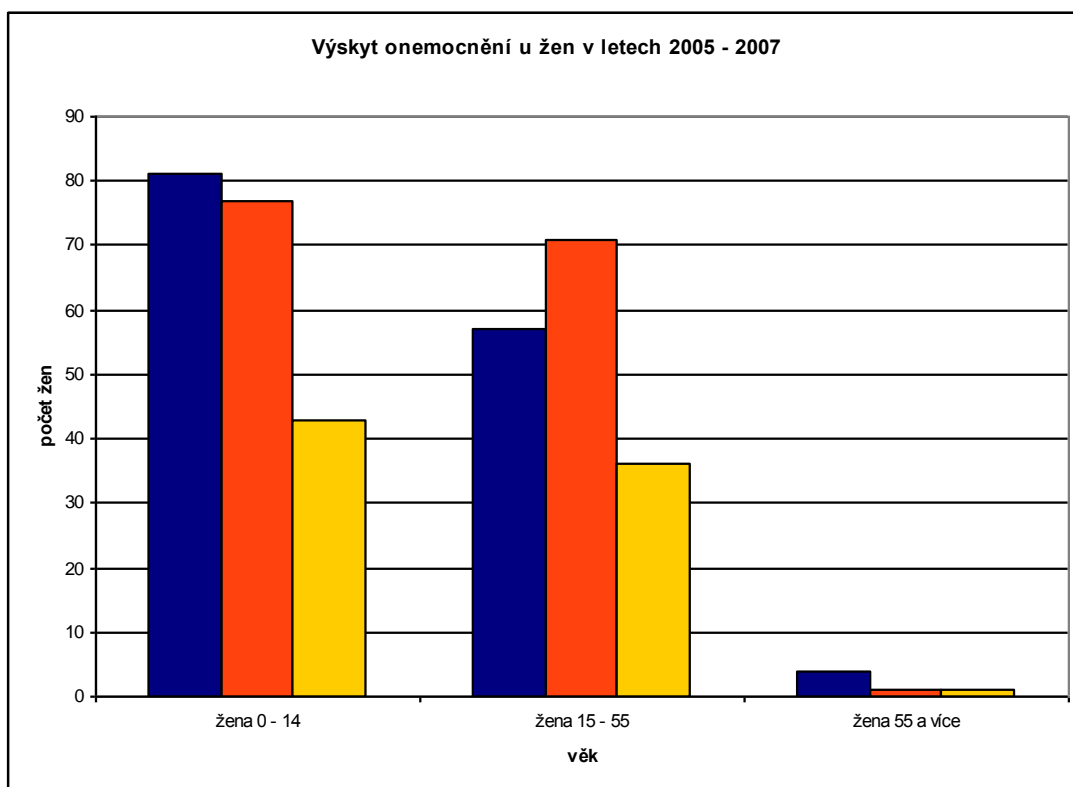
V roce 2007 byla infekcí *M. pneumoniae* ve východočeském kraji nejvíc zasažena věková skupina 5 – 14 let (42,7 % nakažených pacientů) a dále skupina 15 – 25 let (30,9 %), což odpovídá epidemiologii onemocnění. Nejméně nemocných bylo ve skupině 46 – 55 let (0,8 %).

V roce 2006 byla infekcí *M. pneumoniae* rovněž nejvíc nakažena věková skupina 5 – 14 let (46,6 %) a skupina 15 – 25 let (31,3 %). Znovu můžeme pozorovat nejnižší výskyt onemocnění ve skupině 46 – 55 let (0,4 %).

V roce 2005 opět sledujeme nejvyšší výskyt infekcí způsobených *M. pneumoniae* ve věkové skupině 5 – 14 let (52,1 %) a ve skupině 15 – 25 let (35,5 %). V tomto roce nebyl zaznamenán ve východočeském kraji žádný případ ve věkové skupině 46 – 55 let.

Tabulka 7. Výskyt infekcí způsobených *M. pneumoniae* u žen a mužů v letech 2005 - 2007

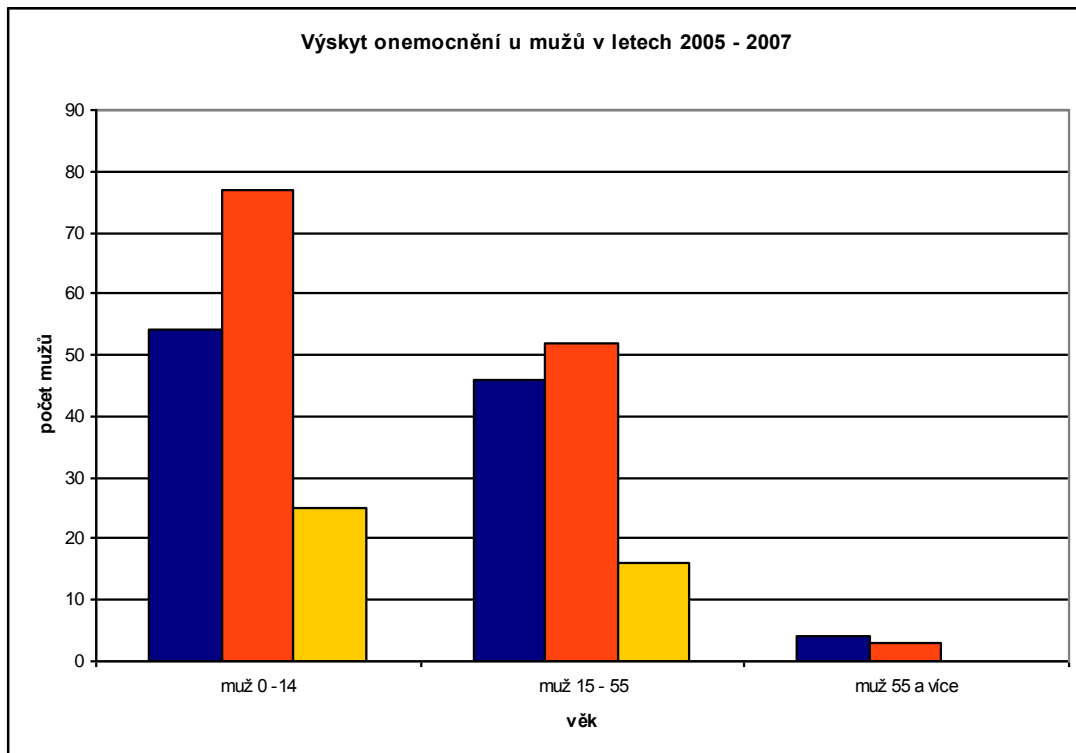
pohlaví	Výskyt 2007	Výskyt 2006	Výskyt 2005
žena 0 - 14	81	77	43
žena 15 - 55	57	71	36
žena 55 a více	4	1	1
muž 0 -14	54	77	25
muž 15 - 55	46	52	16
muž 55 a více	4	3	0



Graf 4. Výskyt infekcí způsobených *M. pneumoniae* u žen v letech 2005 - 2007

V pozorovaném období sledujeme, že ve věkové skupině 0 – 14 let onemocnělo nejvíce žen v roce 2007 (81 žen). Stejný fakt pozorujeme i ve věkové skupině 56 a více let (4 ženy). Ve skupině 15 – 56 let onemocnělo nejvíce žen v roce 2006 (71 žen).



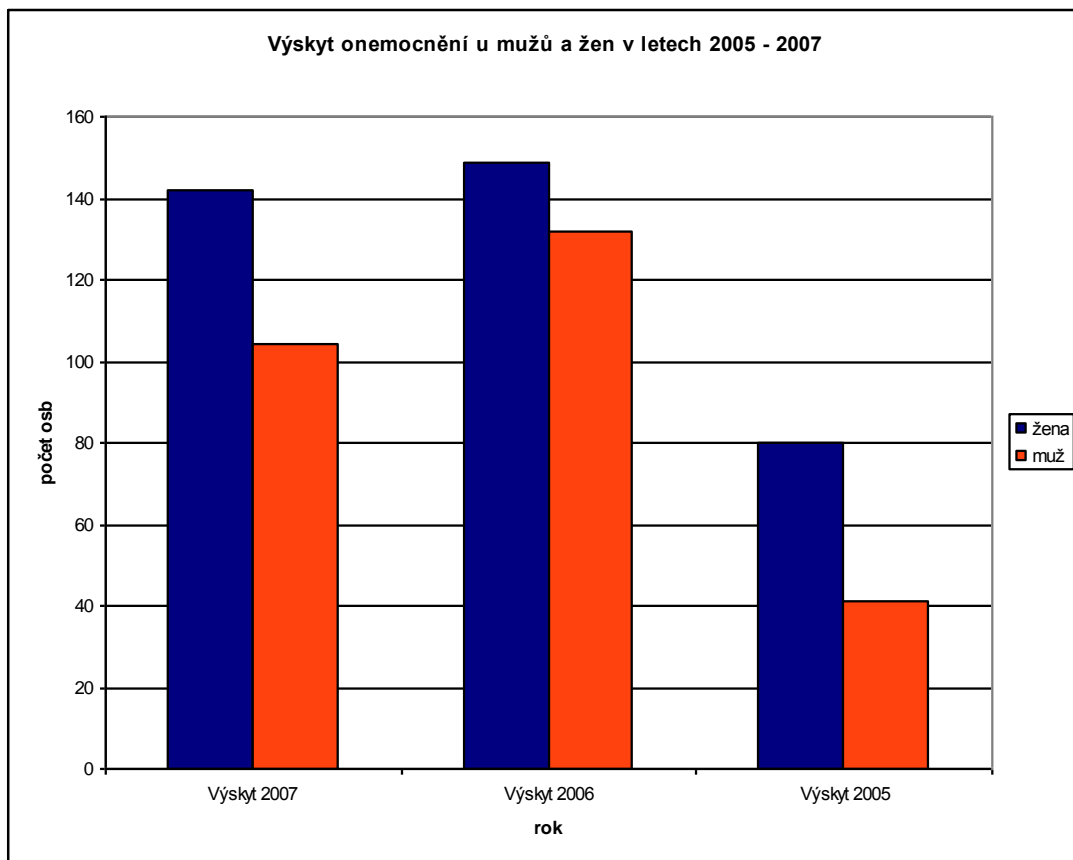


Graf 5. Výskyt infekcí způsobených *M. pneumoniae* u mužů v letech 2007 - 2005

V tomto období bylo u mužů nejvíce případů zaznamenáno v roce 2006, a to ve věkových skupinách 0 -14 let (77 mužů) a 15 -56 let (52 mužů). Ve věkové skupině 56 a více let bylo nejvíce případů zaznamenáno v roce 2007 (4 muži).

Tabulka 8. Celkový výskyt infekcí způsobených *M. pneumoniae* u mužů a žen v letech 2005 - 2007

pohlaví	Výskyt 2007	Výskyt 2006	Výskyt 2005
žena	142	149	80
muž	104	132	41



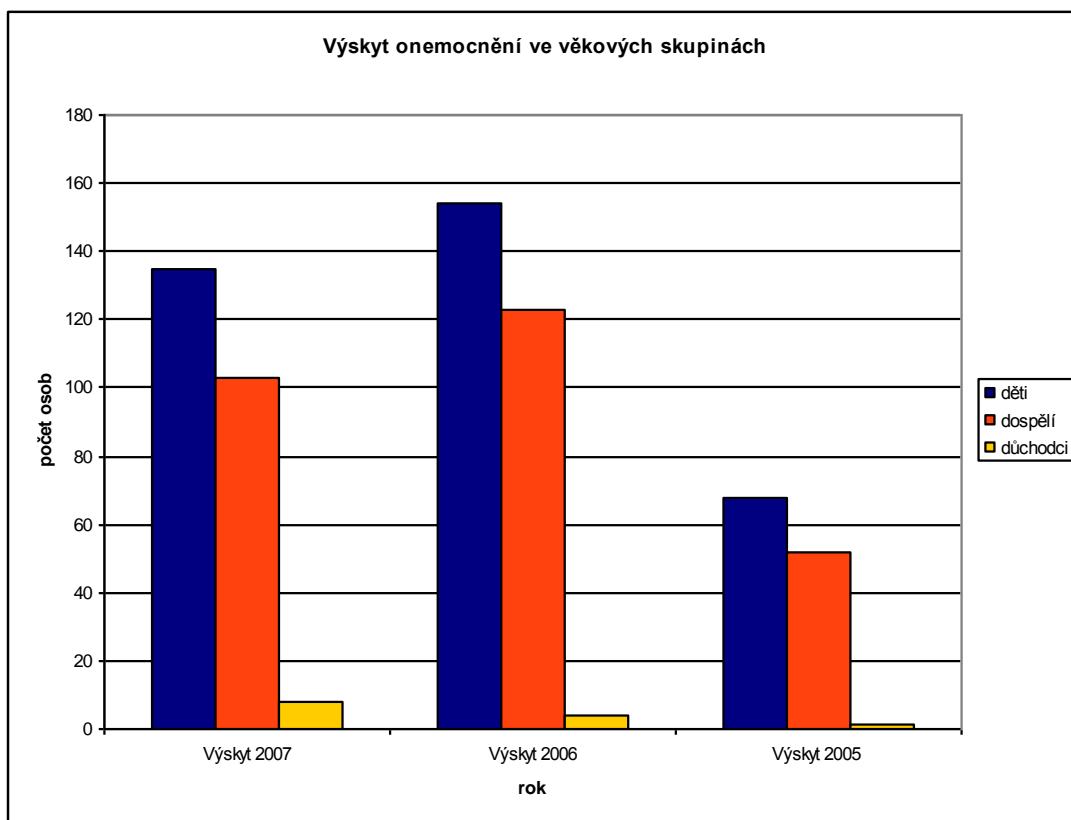
Graf 6. Celkový výskyt infekcí způsobených *M. pneumoniae* u mužů a žen v letech 2005 - 2007

Ve sledovaném období pozorujeme nejvíce nemocných mužů i žen v roce 2006 (149 žen a 132 mužů).

V období 2005 – 2007 bylo více nemocných žen (57,3 %) než mužů (42,7 %).

Tabulka 9. Výskyt infekcí způsobených *M. pneumoniae* ve věkových skupinách v letech 2005 - 2007

věková skup.	Výskyt 2007	Výskyt 2006	Výskyt 2005
děti	135	154	68
dospělí	103	123	52
důchodci	8	4	1



Graf 7. Výskyt infekcí způsobených *M. pneumoniae* ve věkových skupinách v letech 2005 - 2007

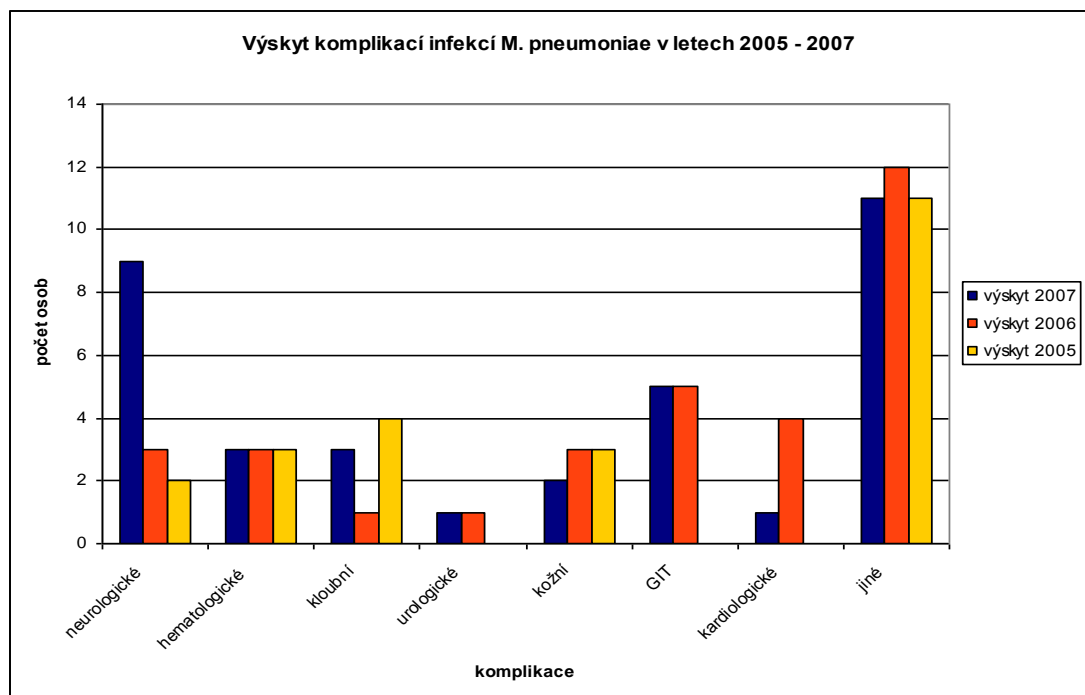
V daném období pozorujeme, že nejvíce nemocnou věkovou skupinou byly děti (55,1 %), a to za celé pozorované období. Nejméně nemocní byli senioři (2 %). V tomto případě byly za děti považovány osoby ve věku 0 – 14 let, za dospělé osoby ve věku 15 – 55 let a za seniory osoby starší 56 let.

Tabulka 10. Výskyt komplikací infekce způsobené *M. pneumoniae* v letech 2005 - 2007

komplikace	výskyt 2007	výskyt 2006	výskyt 2005
neurologické	9	3	2
hematologické	3	3	3
kloubní	3	1	4
urologické	1	1	0
kožní	2	3	3
GIT	5	5	0
kardiologické	1	4	0
jiné	11	12	11

Tabulka 11. Celkový výskyt komplikací infekce způsobené *M. pneumoniae* v letech 2005 - 2007

komplikace	celk. výskyt	%
neurologické	14	2,2
hematologické	9	1,4
kloubní	8	1,2
urologické	2	0,3
kožní	8	1,2
GIT	10	1,5
kardiologické	5	0,8
jiné	34	5,3
		13,9



Graf 8. Výskyt komplikací infekce způsobené *M. pneumoniae* v letech 2005 - 2007

V pozorovaném období trpělo nejvíce osob neurologickými komplikacemi, konkrétně v roce 2007 (9 osob), a dále komplikacemi gastrointestinálními, a to v letech 2007 a 2006 (v obou letech 5 osob). Nejméně pozorovanými komplikacemi byly komplikace urologické.

Souhrnně lze říci, že v letech 2005 – 2007 nejvíce pacientů trpělo neurologickými komplikacemi (2,2 %), dále komplikacemi gastrointestinálními (1,5 %) a hematologickými (1,4 %). Nejméně vyskytujícími se komplikacemi byly komplikace kardiologické (0,8 %) a urologické (0,3 %).

## 8. Diskuze

Výskyt mykoplazmových infekcí je nejčastější u dětí ve věku 5 – 14 let a u mladých dospělých do 29 let, což potvrzuje i moje práce. V pozorovaném období onemocnělo infekcemi způsobenými *M. pneumoniae* 299 dětí, což činí 46,1 % z celkového počtu nemocných osob, a 207 mladistvých, což činí 31,9 % z celkového počtu nemocných, přičemž nejvíce nemocných v těchto věkových kategoriích bylo v roce 2006. Podle studie Fang-Ching Liu a kol. byla infekce *M. pneumoniae* prokázána u 41,6 % dětí (18). Jiná studie týčž autorů potvrdila vyšší výskyt mykoplazmových infekcí u dětí než u dospělých (19). Podle studie Naoyuki Miyashita a kol. se mykoplazmová infekce objevila u 15,2 % osob starších 60 let (20). V mém případě byl výskyt mykoplazmových infekcí u osob starších 56 let 2,1 %.

Rovněž jsem zjistila, že během sledovaného období onemocnělo více žen (57,3% z celkového počtu nemocných) než mužů (42,7%). Průzkum Ústavu zdravotnických informací a statistiky prokázal, že ženy trpí infekcemi horních cest dýchacích častěji než muži (17). Důvodem bude patrně vyšší vnímavost žen k těmto infekcím. Dále můžeme opět pozorovat, že nejvyšší výskyt onemocnění podle tohoto rozdělení byl v roce 2006. Výskyt onemocnění v roce 2007 byl nepatrně nižší.

V pozorovaném období pak bylo nejvíce nemocných v roce 2006 (11 % z celkového počtu pacientů). Epidemie nebyla pozorována.

Během své práce jsem taky sledovala výskyt komplikací infekcí způsobených *M. pneumoniae*. Ty vznikají v důsledku autoimunitních reakcí v organizmu. V pozorovaném období nejvíce osob trpělo neurologickými komplikacemi (2,2 % z celkového počtu nemocných) a dále komplikacemi gastrointestinálními (1,5 %). Z neurologických komplikací se vyskytovaly zejména meningitidy a polyneuropatie, z gastrointestinálních pak hepatitidy, dyspepsie a průjmy. Dále se vyskytovaly komplikace hematologické (anemie a imunodeficience), kloubní (artritidy a radikulopatie), kožní (různé druhy dermatitid), kardiologické (perikarditidy a myokarditidy), urologické (nefritidy) a jiné komplikace (zejména plicní). Celkový výskyt komplikací pak byl 13,9 % z celkového počtu nemocných. Podle studie A. Kapellerové a kol. se plicní

komplikace vyskytly v 16,1 % případů, mimoplicní komplikace byly zaznamenány v 12,7 % případů. Z mimoplicních komplikací se nejčastěji vyskytovaly gastrointestinální (8 %), neurologické (1,1 %) a kožní (1,1 %) komplikace (8).

Ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové se ke stanovení infekcí způsobených *M. pneumoniae* využívá metoda ELISA. Jedná se o sérologickou metodu, kdy se stanovuje hladina specifických IgM nebo IgG protilátek. Důkazem mykoplazmové infekce je vzestup specifických IgM protilátek do 7. až 10. dne od začátku onemocnění nebo minimálně čtyřnásobný vzestup titru specifických IgG protilátek u rekonvalescentních pacientů za 3 týdny od začátku onemocnění (8). Při použití této metody je nutno mít na vědomí možnost zkřížených reakcí. Proto ke stanovení infekcí způsobených *M. pneumoniae* nestačí pouze metoda ELISA nebo jakákoliv jiná diagnostická metoda, ale je nutné přihlížet dále k rentgenologickému nálezu a ke klinickým příznakům.

## **9. Závěr**

Během své práce jsem zjistila, že infekce způsobené *M. pneumoniae* nejvíce postihují děti ve věku 5 – 14 let a mladistvé do 25 let věku. Ve východočeském regionu v pozorovaném období onemocnělo více žen než mužů a nejvyšší výskyt onemocnění byl v roce 2006. Nejčastěji se vyskytujícími komplikacemi byly komplikace neurologické a gastrointestinální. Komplikace se vyskytly v 13,9 % případů. K léčbě mykoplazmových infekcí se používají zejména makrolidy, alternativou jsou pak tetracykliny nebo fluorochinolony.



## 10. Seznam použité literatury

1. Barron S. a kol.: Medical Microbiology. 4. edition, kap. Mycoplasmas [online], The University of Texas Medical Branch: Galveston, 2000.  
Dostupné z:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mmed.TOC&depth=2>
2. Bednář M., Souček A., Vávra J.: Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie. Triton: Praha, 1994, str. 141 – 144.
3. Catrein I., Dumke R., Weiner, III J., Jacobs E. and Hermann R.: Cross-complementation between the products of the genes P1 and ORF6 of *Mycoplasma pneumoniae* subtypes 1 and 2. Microbiology, 2004;150:3989 – 4000.
4. Dubos, Hirsch: Bakteriální a myotické infekce člověka. Státní zdravotnické nakladatelství, 1967, str. 826 – 827.
5. Greenwood D., Slak R. C. B., Pentherer J. F. a kol.: Lékařská mikrobiologie. Grada: Praha, 1999, str. 389 – 398.
6. Howard B. J.: Clinical and pathogenic mikrobiology. Mosby: St. Louis, 1987, str. 491- 495.
7. Kapellerová A., Zlocha J., Kuková Z., Luptáková M., Tarhini A.: Mykoplazmové pneumonie v detskom veku. Čes. – slov. Pediatr. 2007; 62 (1):16 – 24.
8. Jobovská A.: Infekční nemoci. Karolinum: Praha, 2001, 154.
9. Madigan, Martinko and Parker: Biology of Microorganism. 8. edition, Southern Illinois University: Carbondale, 2000, str. 54 – 110.
10. Návod na použití testu ELISA (SeroMP™ IgG).
11. Patočková F. a kol.: Lékařská mikrobiologie. Avicenum: Praha, 1970, str. 595 – 596.
12. Regula J. T. , Boguth G., Görg A., Hegermann J., Mayer F., Frank R. and Hermann R.: Defining the *mycoplasma* 'cytoskeleton': the protein composition of the Triton X-100 insoluble fraction of the bacterium

*Mycoplasma pneumoniae* determined by 2-D gel electrophoresis and mass spektrometry. Microbiology 2001;147:1045 – 1057.

13. Syrůček L., Brůčková M., Vojtěchovský K.: Mykoplazmové infekce člověka. Avicenum: Praha, 1985, str. 5 – 50.
14. Toršová V. Medková Z.: *Mycoplasma pneumoniae* a *Chlamydia pneumoniae*: Původci respiračních infekcí a jejich vztah k některým chronickým onemocněním. Interní Med. 2001;1:13 – 18.
15. Votava M. a kol.: Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun: Brno, 2003, str. 169 – 172.
16. Brožová J., Daňková Š., Chudobová M., Kamberská Z., Lexová P.: Ženy a muži v číslech zdravotnické statistiky. Ústav zdravotnických informací a statistiky: Praha, 2003, str. 28.
17. Fang-Ching Liu, Po-Yen Chen, Fang-Liang Huang, Chi-Ren Tsai, Chun-Yi Lee, Li-Chung Wang: Rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children by polymerase chain reaction. J Microbiol Immunol Infect. 2007; 40:507 - 512.
18. Fang-Ching Liu, Po-Yen Chen, Fang-Liang Huang, Chi-Ren Tsai, Chun-Yi Lee, Chen – Fu Lin: Do serological tests provide adequate rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection?. Jpn J Infect Dis. 2008;61:397 – 399.
19. Naoyuki Miyashita, Kazunobu Ouchi, Kozo Kawasaki, Keiko Oda, Yasuhiro Kawai, Hiroki Shimizu, Yoshihiro Kobashi, Mikio Oka: *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in the elderly. Med Sci Monit. 2008; 14(8):387 – 391.

## **11. Seznam obrázků**

Obrázek 1. Mikroskopická struktura <i>M. pneumoniae</i> .	11
Obrázek 2. Rozmnožovací cyklus mykoplazmat.	12
Obrázek 3. Diagnostický komplet metody ELISA.	21
Obrázek 4. ELISA pro detekci IgM specifických protilátek.	22
Obrázek 5. Mikrotitrační destička s výsledným zbarvením.	24

## **12. Seznam tabulek**

Tabulka 1. Testy pro sérologickou diagnostiku <i>M. pneumoniae</i>	20
Tabulka 2. Interpretace výsledků	24
Tabulka 3. Hladina <i>M. pneumoniae</i> protilátek	25
Tabulka 4. Výskyt infekcí způsobených <i>M. pneumoniae</i> v letech 2005 – 2007	27
Tabulka 5. Srovnání výskytu infekcí způsobených <i>M. pneumoniae</i> v letech 2005 – 2007	28
Tabulka 6. Srovnání výskytu infekcí způsobených <i>M. pneumoniae</i> v letech 2005 – 2007	29
Tabulka 7. Výskyt infekcí způsobených <i>M. pneumoniae</i> u žen a mužů v letech 2005 – 2007	31
Tabulka 8. Celkový výskyt infekcí způsobených <i>M. pneumoniae</i> u mužů a žen v letech 2005 – 2007	33
Tabulka 9. Výskyt infekcí způsobených <i>M. pneumoniae</i> ve věkových skupinách v letech 2005 – 2007	34
Tabulka 10. Výskyt komplikací infekce způsobené <i>M. pneumoniae</i> v letech 2005 – 2007	35
Tabulka 11. Celkový výskyt komplikací infekce způsobené <i>M. pneumoniae</i> v letech 2005 – 2007	36

### **13. Seznam grafů**

Graf 1. Výskyt infekcí způsobených <i>M. pneumoniae</i> v letech 2005 – 2007	27
Graf 2. Srovnání výskytu infekcí způsobených <i>M. pneumoniae</i> v letech 2005 – 2007	28
Graf 3. Srovnání výskytu infekcí způsobených <i>M. pneumoniae</i> v letech 2005 – 2007	29
Graf 4. Výskyt infekcí způsobených <i>M. pneumoniae</i> u žen v letech 2005 – 2007	31
Graf 5. Výskyt infekcí způsobených <i>M. pneumoniae</i> u mužů v letech 2005 – 2007	32
Graf 6. Celkový výskyt infekcí způsobených <i>M. pneumoniae</i> u mužů a žen v letech 2005 – 2007	33
Graf 7. Výskyt infekcí způsobených <i>M. pneumoniae</i> ve věkových skupinách v letech 2005 – 2007	34
Graf 8. Výskyt komplikací infekce způsobené <i>M. pneumoniae</i> v letech 2005 – 2007	35