

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Výskyt mykoplasmat u psů

Zuzana Dvořáková

Bakalářská práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Zuzana Dvořáková**
Osobní číslo: **C14255**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Výskyt mykoplasmat u psů**
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 :

1. Charakteristika rodu *Mycoplasma*.
2. Druhy vyskytující se u psů.
3. Onemocnění, které způsobují, včetně patogeneze.
4. Laboratorní diagnostika.
5. Možnosti léčby.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

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

Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 26. 6. 2017

Zuzana Dvořáková

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce RNDr. Markétě Vydržalové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytla při zpracování bakalářské práce.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá patogenními mykoplasmaty vyskytující se u psů, které způsobují onemocnění respiračního i urogenitálního traktu a anémie. V práci jsou popsány morfologické vlastnosti mykoplasmat, včetně taxonomie, patogeneze a onemocnění, které způsobují. Nakonec jsou uvedené možnosti laboratorní diagnostiky, terapie a prevence.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mykoplasmata, pes, infekce, laboratorní diagnostika, terapie

TITLE

The incidence of mycoplasma in dogs

ANNOTATION

Bachelor thesis deals with pathogenic mycoplasmata occurring in dogs that cause diseases of respiratory, urogenital tract and anemia. In the thesis are described the morphology characteristics of mycoplasma, including taxonomy, pathogenesis and diseases that causes. Finally, there are presented the possibilities of laboratory diagnostics, therapy and prevention.

KEYWORDS

Mycoplasmata, dog, infection, laboratory diagnostics, therapy

OBSAH

1	Úvod	12
2	Charakteristika rodu <i>Mycoplasma</i>	13
2.1	Historie.....	13
2.2	Taxonomie.....	13
2.3	Morfologie a množení buněk.....	14
2.4	Genová výbava vybraných druhů mykoplasmat.....	16
2.4.1	<i>Mycoplasma cynos</i>	16
2.4.2	<i>Mycoplasma canis</i>	17
2.4.3	<i>Mycoplasma haemocanis</i>	17
2.5	Antigenní struktura a faktory virulence.....	18
2.6	Patogeneze.....	21
2.7	Biochemické vlastnosti.....	22
3	Onemocnění u psů vyvolané mykoplasmaty	24
3.1	Infekce respiračního traktu psů.....	25
3.2	Infekce urogenitálního traktu.....	26
3.3	Hemoplasmové infekce.....	27
3.4	Infekce CNS.....	30
4	Laboratorní diagnostika	32
4.1	Vyšetřovaný materiál.....	32
4.2	Přímá diagnostika.....	32
4.2.1	Mikroskopie.....	32
4.2.2	Biochemické testy.....	32
4.2.3	Kultivační vyšetření.....	33
4.2.4	Molekulárně biologické metody.....	35
4.2.5	Ostatní metody.....	36
4.3	Nepřímá diagnostika.....	36
5	Terapie a prevence	37
5.1	Citlivost na antibiotika.....	37
5.2	Prevence.....	38
6	Závěr	39
7	Seznam použité literatury	40

8	Zdroje obrázků a tabulek	48
----------	---------------------------------------	-----------

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura mykoplasmové kolonie.....	15
Obrázek 2: Dělení mykoplasmat.....	16
Obrázek 3: Genom <i>Mycoplasma haemocanis</i>	18
Obrázek 4: Schéma struktury amino-konce bakteriálních lipoproteinů.....	19
Obrázek 5: Vnitrodruhová variace sialidázové aktivity <i>Mycoplasma canis</i>	20
Obrázek 6: Schéma fúze mykoplasmat s eukaryotickou buňkou.....	22
Obrázek 7: Hnisavý výpotek na spodině lebeční.....	31
Obrázek 8: Krevní nátěr psa s <i>Mycoplasma haemocanis</i>	33
Obrázek 9: Neobarvené kolonie <i>Mycoplasma cynos</i> charakteristického vzhledu tzv. sázeného vejce pod mikroskopem (zvětšeno 40x).....	34
Obrázek 10: Řez kolonií mykoplasmat rostoucí na agaru.....	35

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Taxonomická klasifikace rodu <i>Mycoplasma</i>	13
Tabulka 2: Biochemické vlastnosti vybraných druhů mykoplasmat.....	23
Tabulka 3: Druhy mykoplasmat vyskytující se u psů.....	24

SEZNAM ZKRATEK

A.	<i>Acholeplasma</i>
bp	pár bází
CAdV-2	psí adenovirus typu 2 (z angl. canine adenovirus)
CBoV	psí bocavirus (z angl. canine bocavirus)
CDS	kódující sekvence (z angl. coding DNA sequence)
CDV	virus psinky (z angl. canine distemper virus)
CHV	psí herpesvirus (z angl. canine herpesvirus)
CIRD	psí infekční respirační onemocnění (z angl. canine infectious respiratory disease)
CnPnV	psí pneumovirus (z angl. canine pneumovirus)
CNS	centrální nervový systém
CPIV	psí parainfluenza (z angl. canine parainfluenza virus)
CRCoV	psí respirační koronavirus (z angl. canine respiratory coronavirus)
Da	dalton
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	test enzymové imunoanalýzy
G + C	guanin a cytosin
GME	granulomatózní meningoencefalomyelitida
IHT	test inhibice hemaglutinace
IL	interleukin
IMHA	imunitní reakcí zprostředkovaná hemolytická anémie

INF	interferon
kb	kilo párů bází
<i>M.</i>	<i>Mycoplasma</i>
MIT	test inhibice metabolismu
MK	masná kyselina
NK	přirození zabíječi (z angl. natural killer cells)
nm	nanometr
NME	nekrotizující meningoencefalitida
PCR	polymerázová řetězová reakce
PFGE	pulzní gelová elektroforéza (z angl. pulsed field gel electrophoresis)
PPO	původci pleuropneumonie (z angl. Pleuro-Pneumonia Organism)
PPLO	původci lidské primární atypické pneumonie (z angl. Pleuro-Pneumonia-Like Organism)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RIA	test radioimunoanalýzy
RIT	test inhibice růstu
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
rRNA	ribosomální RNA
subs.	poddruh (z angl. subspecies)
tRNA	transferová RNA
<i>U.</i>	<i>Ureaplasma</i>
U/CFU	enzymová jednotka na kolonii tvořící jednotku (z angl. colony forming unit)

1 Úvod

Mykoplasmata jsou nejmenší bakterie schopné samostatné existence mimo hostitelskou buňku. Patří do třídy *Mollicutes*, která zahrnuje mikroorganismy vyskytující se u rostlin, hmyzu i vyšších živočichů včetně člověka. Některé druhy jsou komenzálové, saprofyté, ale uplatňují se i jako patogeny. Postrádají pevnou buněčnou stěnu, proto je obsah cytoplazmy ohraničen pouze třívrstevnou membránou.

Mykoplasmata u psů mohou být součástí normální mikroflóry horních dýchacích cest i dolního genitálního traktu. Některé konkrétní druhy jsou spojovány s onemocněním psů jako například *Mycoplasma (M.) cynos* způsobující infekce dýchacích cest dále *M. canis* spojované s infekcí urogenitálního traktu či *M. haemocanis* s psí anémií.

Klinický materiál k průkazu mykoplasmat se odebírá podle druhu onemocnění, před léčbou antibiotiky. Pro průkaz respiračních infekcí je užíváno sputum či výtěry z nosní a spojivkové sliznice. U onemocnění urogenitálního traktu se odebírá sperma, moč, výtěry z uretry či vaginální stěry.

Kultivace mykoplasmat je náročná. Mikroorganismy mají vysoké růstové požadavky na kultivační média a jsou lehce přerůstány jinými bakteriemi. Nejčastěji se používají PPLO agary či bujóny. Na pevných půdách vytváří mykoplasmata drobné kolonie, které jsou viditelné pouze mikroskopem. Pokrok v diagnostice mykoplasmat přinesl až vývoj citlivé polymerázové řetězové reakce PCR, avšak doposud není dostupná žádná komerční PCR metoda pro detekci psích mykoplasmat.

Léky první volby v terapii mykoplasmových infekcí jsou tetracyklinová a makrolidová antibiotika. V dnešní době však narůstá rezistence na antibiotika. Vhodnou alternativou jsou fluorochinolová antibiotika.

Cílem bakalářské práce je vytvoření literární rešerše zaměřené na charakteristiku mykoplasmat, onemocnění u psů způsobené tímto patogenem, jeho laboratorní diagnostiku, léčbu a prevenci.

2 Charakteristika rodu *Mycoplasma*

2.1 Historie

První mykoplasmata byly popsány jako původci pleuropneumonie u skotu (Walter, 1998). Roku 1898 tyto bakterie poprvé vykultivovali Nocard a Roux (Browning a Citti, 2014). Dlouhou dobu byly považovány za viry, protože díky své velikosti mohly projít přes póry bakteriálního filtru (Walker, 1998). Tito původci bovinní pleuropneumonie byli později označeni jako *Mycoplasma mycoides* subs. *mycoides* (Quinn et al., 1994). Spolu s podobnými patogenními a saprofytickými mikroby izolovanými z člověka a zvířat byly původně pojmenovány jako PPO (Pleuro-Pneumonia Organisms), později PPLO a nyní se nazývají mykoplasmata (Greenwood et al., 1999). Na konci první poloviny 20. století byly mykoplasmata známé jako Eatonovo agens způsobující primární atypické pneumonie u lidí. Později byl název Eatonův agens změněn na *M. pneumoniae* (Walker, 1998).

2.2 Taxonomie

Mykoplasmata patří do zvláštní skupiny bakterií třídy *Mollicutes* (z latinského názvu mollis - měkký, cutis - kůže) (Bednář et al., 1996). Názvem mykoplasmata jsou označovány jakékoliv mikroorganismy této třídy bez ohledu na to, zda patří do rodu *Mycoplasma* (Greenwood et al., 1999). Vědecká klasifikace rodu *Mycoplasma* je uvedena v tabulce 1.

Tabulka 1: Taxonomická klasifikace rodu *Mycoplasma* (Sedláček, 2007).

Doména	<i>Bacteria</i>
Kmen	<i>Firmicutes</i>
Třída	<i>Mollicutes</i>
Řád	<i>Mycoplasmatales</i>
Čeleď	<i>Mycoplasmataceae</i>
Rod	<i>Mycoplasma</i>

Fylogeneticky je třída *Mollicutes* spojována s gram-pozitivními bakteriemi, z nichž se vyvinuly redukcí genomu. Tato třída obsahuje čtyři řády - *Mycoplasmatales* zahrnující mikroorganismy, které způsobují infekce u lidí a zvířat, *Entomoplasmatales* vyskytujících se u hmyzu a rostlin, *Anaeroplasmatales* infikují převážně ovce a skot, poslední řád je *Acholeplasmatales* vyskytující se u zvířat, rostlin a hmyzu (Rottem, 2003; Stülke et al., 2009). Studie prováděné na ribozomálních RNA genech také ukázaly, že mykoplasmata jsou nejbližší skupině laktobacilů (Svoboda et al., 1996). Taxonomie psích mykoplasmat je popsána na základě fylogenetické analýzy 16S rRNA (Chalker a Brownlie, 2004).

Rod *Mycoplasma* sdružuje zhruba 125 druhů a 4 poddruhy (bacterio.net). V tomto množství druhů jsou některé z nich komenzálové, jiné mohou být i patogeny. Z humánního klinického materiálu bylo vypěstováno šestnáct druhů. Nejčastěji se vyskytují *M. orale*, *M. salivarium* a *M. pneumoniae* v dutině ústní a v dýchacích cestách, další druhy jako *M. hominis*, *M. fermentans*, *M. genitalium* a *M. penetrans* z urogenitálního traktu mužů i žen (Votava et al., 2003).

Poprvé byly mykoplasmata izolovány u psů v roce 1934. Bylo objeveno 15 známých druhů a 2 další, které nejsou ještě zcela popsány: *Acholeplasma (A.) laidlawii*, *M. arginini*, *M. bovinegenitalium*, *M. canis*, *M. cynos*, *M. edwardii*, *M. feliminutum*, *M. felis*, *M. gateae*, *M. haemocanis*, *M. maculosum*, *M. molare*, *M. opalescens*, *M. sp. HRC689*, *M. sp. VJC358*, *M. spumans* a *Ureaplasma (U.) canigenitalium* (Spergser a Rosengarten, 2007). Někteří autoři zařazují mezi psí mykoplasmata také *M. collis* nicméně doposud neexistuje žádné potvrzení, že tento druh způsobuje infekce u psů (Chalker a Brownlie, 2004).

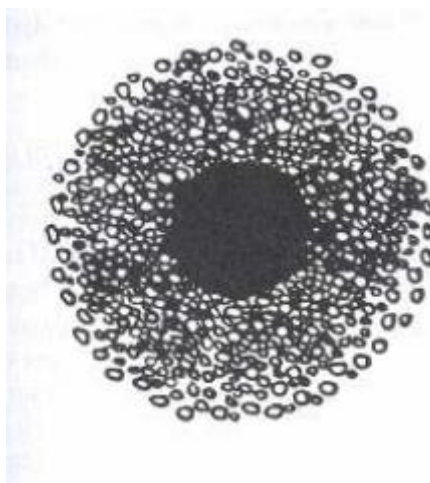
2.3 Morfologie a množení buněk

Mykoplasmata jsou nejmenší a nejjednodušší mikroorganismy schopné mimobuněčné existence, které se od jiných bakterií odlišují absencí pevné buněčné stěny. Řadí se mezi fakultativně anaerobní bakterie, které jsou většinou nepohyblivé (některé druhy se pohybují klouzáním) (Sedláček, 2007).

Na povrchu buňky mají pouze třívrstevnou membránu o šířce 7,5 až 10 nm, která se skládá ze dvou elektronopticky hutných vrstev a mezi nimi je jedna řídká průsvitná vrstva (Razin et al., 1963). Řídká část obsahuje lipidy s mastnými kyselinami o dlouhých řetězcích obrácených dovnitř a s polárními skupinami vně i dovnitř buňky. Elektronopticky hutné vrstvy se skládají z bílkovin a polysacharidů (Greenwood et al., 1999). Na rozdíl od běžných

bakterií mají v cytoplazmatické membráně steroly, jež pak musí být přítomny i v jejich kultivačním médiu (Klaban, 2005). Důležitou částí je také sterol vmezeřený mezi molekuly fosfolipidu, který zajišťuje osmotickou integritu buňky (Greenwood et al., 1999). Mykoplasmata nemají a nedokážou tvořit peptidoglykan, proto neobsahují specifické látky buněčné stěny jako je kyselina muramová a kyselina diaminopimelová (Bednář et al., 1996; Razin et al., 1963). V cytoplazmě se nacházejí ribozomy a molekuly kruhové dvouřetězcové DNA (Svoboda et al., 1996). Obsah DNA kolísá od 1,5 do 4 % suché hmotnosti (Greenwood et al., 1999). Procentuální obsah G + C jejich DNA je velmi nízký a pohybuje se mezi 23 až 40 % (Sedláček, 2007). DNA je ale bohatá na adenin a thymin. Uvnitř cytoplazmy se také nachází fibrilární síť, která představuje primitivní cytoskelet (Svoboda et al., 1996).

Bakterie mají pleomorfní charakter díky nepřítomnosti buněčné stěny (Votava et al., 2003). Mykoplasmata tedy snadno mění svůj tvar, k čemuž jim výrazně napomáhá právě fibrilární síť v cytoplazmě (Svoboda et al., 1996). Základní formou je kokovitě tělísko, ale u zralých kultur lze pozorovat i větší oválné buňky až vláknité či korálkovité kolonie [obr. 1] (z toho pochází název mykes - houba, plasma - tvar) (Bednář et al., 1996).



Obrázek 1: Struktura mykoplasmové kolonie (Bednář et al., 1996).

Velikost buněk je různá obvykle od 0,3 do 0,8 μm v průměru (Klaban, 2005). Proto mohou díky své velikosti procházet přes póry bakteriologických filtrů (Votava et al., 2003). Genom mykoplasmat má velikost 5×10^8 - 1×10^9 Da a je 4 - 8x menší než genom jiných bakterií (Svoboda et al., 1996). Molekulová hmotnost nejmenšího genomu je asi 45×10^6 Da což je nejmenší obsah genetické informace nutný pro nezávislé množení mimo buňku (Greenwood et al., 1999).

Nejmenší jednotka mykoplasmat schopná reprodukce je přibližně kulovitá, o průměru 200 - 250 nm (Greenwood et al., 1999). Tyto mikroorganismy se množí binárním dělením [obr. 2] (Vařejka et al., 1989). Dělení cytoplazmy nemusí být synchronizováno s replikací jádra a tímto opožděným dělením vznikají mnohojaderná vlákna [obr. 2] a řetízky, které se mohou rozpadat na kokovitá tělíska (Bednář et al., 1996). Tyto korálkovité řetízky se tvoří zaškrcováním membrány v místech mezi dvěma genomy. Dalším možným způsobem dělení mikrobů je pučení, které nastává jestliže se mezi dvě dceřiné buňky nerozdělí cytoplazma rovnoměrně (Greenwood et al., 1999).



Obrázek 2: Dělení mykoplasmat (Bednář et al., 1996)

a) binární dělení,

b) tvorba mnohojaderných vláken a jejich rozpad v kokovitá tělíska.

Nepřítomnost kompletní buněčné stěny zapříčiňuje, že mykoplasmata se nebarví Gramovou metodou, je však možné je obarvit podle Giemsky nebo Romanowského (Votava et al., 2003; Quinn et al, 1994).

2.4 Genová výbava vybraných druhů mykoplasmat

2.4.1 *Mycoplasma cynos*

Nedostatek sekvence genomu omezuje molekulární charakterizaci *M. cynos* a její roli v patogenezi CIRDC (z angl. canine infectious respiratory disease). *M. cynos* C142 bylo izolováno z tracheálního výplachu psa vykazujícího příznaky CIRDC. Kompletní genom *M. cynos* C142 se skládá z jednoho do kruhu stočeného chromozomu o velikosti 998 123 bp. Průměrný obsah G + C v genomu je asi 26 % což je srovnatelné s *M. mycoides* 24 % (mnohem nižší než u *M. pneumoniae* 40 %). Odhadnuto bylo celkem 883 CDS což znamená

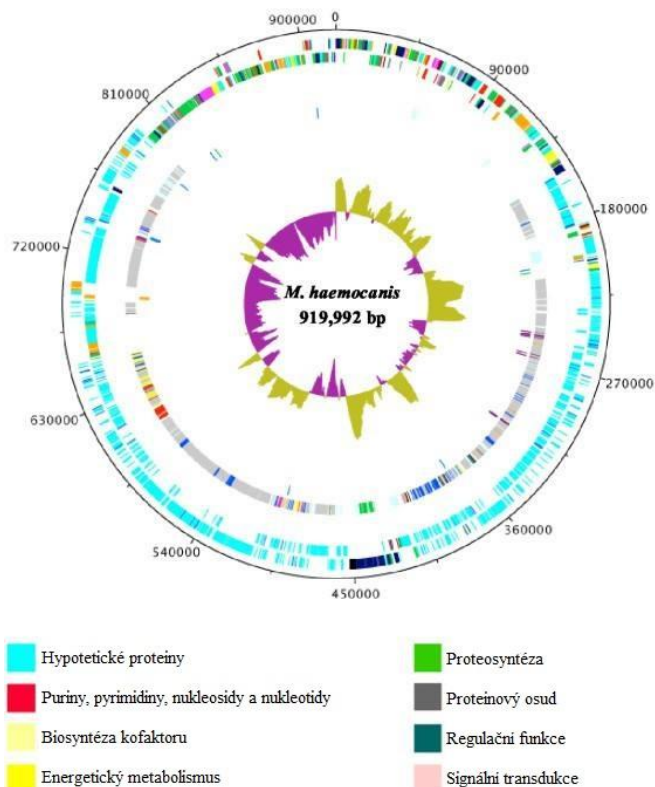
asi 1 CDS na kb, z nichž 491 mělo přiřazeno domnělou funkci. 136 by se mohlo podílet na zpracování genetické informace, 41 na zpracování informací o životním prostředí a 5 by se mohlo podílet na buněčných procesech (Walker et al., 2013).

2.4.2 *Mycoplasma canis*

Celková velikost genomu *M. canis* PG14^T je asi 795 000 bp odhadovaných pomocí PFGE (pulzní gelová elektroforéza). Obsah G + C v genomu je 27 %. Z 696 předpokládaných otevřených čtecích rámců mají asi tři čtvrtiny přiřazené funkce včetně 31 strukturálních RNA. 31 proteinů se podílí na metabolismu AMK, purinů, pyrimidinů, nukleosidů, kofaktorů, prostetické skupiny, 7 proteinů účastnících se metabolismu MK nebo fosfolipidů. 75 proteinů je zapojeno do energetického nebo intermediárního metabolismu, 71 proteinů se podílí na dopravě či vazbě, přes 257 proteinů ovlivňuje metabolismus NK, transkripce i translace. 10 proteinů se podílí na regulačních funkcích a 12 proteinů se účastní buněčného dělení. Sekvenční variace mezi kmeny PG14^T, UF31 a UF33 v katalytických stránkách sialidázy *M. canis* pravděpodobně vysvětluje kmenové rozdíly ve specifické aktivitě tohoto enzymu (Brown et al., 2012).

2.4.3 *Mycoplasma haemocanis*

M. haemocanis (hemoplasma) je krevní patogen, který může vyvolat akutní onemocnění u imunosuprimovaných psů nebo u psů u nichž byla odstraněna slezina. Genom kmene Illinois, který byl získán z krve infikovaného psa, byl sekvenován a popsán, aby se lépe porozumělo biologii *M. haemocanis*. Jeho genom se skládá z jednoho kruhového chromozomu o velikosti 919 992 bp s nízkým obsahem G + C (35 %). Naznačena je přítomnost celkem 1173 CDS a 31 tRNA zahrnující všechny AMK. Funkce většiny CDS tzn. 887 jsou reprezentovány jako hypotetické proteiny (75,62 %), 96 se uplatňuje při proteosyntéze, 44 při metabolismu DNA a 25 při energetickém metabolismu, 14 se podílí na buněčných procesích [obr. 3]. Předpokládá se, že snížené metabolické dráhy hemoplasmy jsou důsledkem adaptace na živiny v bohatém krevním prostředí a je pravděpodobné, že *M. haemocanis* využívá metabolismus erytrocytů (do Nascimento et al., 2012).



Obrázek 3: Genom *Mycoplasma haemocanis* (do Nascimento et al., 2012).

2.5 Antigenní struktura a faktory virulence

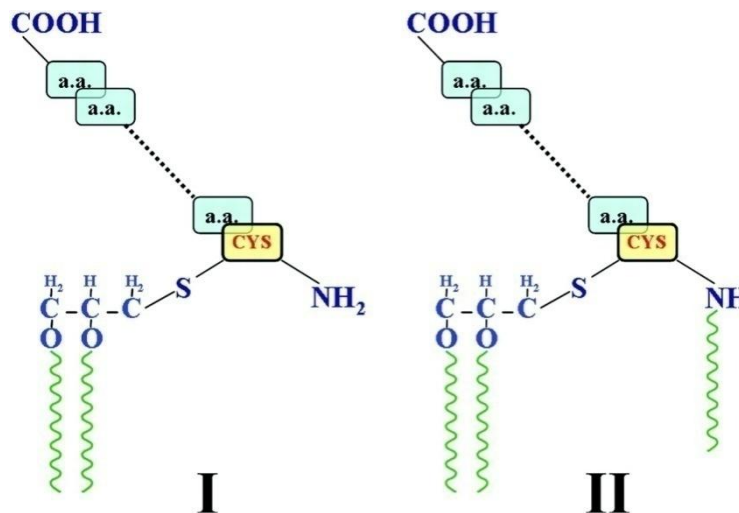
Antigenní struktura je u zástupců mykoplasmat odlišná (Votava et al., 2003). Antigeny mohou být skupinově nebo druhově specifické (Vařejka et al., 1989). Mezi dominantní antigeny mykoplasmat patří membránové lipoproteiny. Velké množství lipoproteinů u třídy *Mollicutes* je přičítáno nepřítomnosti periplazmatického prostoru (Razin et al., 1998). Všechny membránové lipoproteiny obsahují aminoterminální cysteinylový zbytek [obr. 4], který je u mykoplasmat zřídka N - acylován. Chemickými analýzami mykoplasmových lipoproteinů bylo zjištěno, že jejich schopnost přichycení zbytku MK nebo lipidu k molekule je podobný jak u gram-negativních tak i gram-pozitivních bakterií (Rottem, 2003). Z posledních biochemických studií mykoplasmat se předpokládá, že vnější membránové lipoproteiny a glykolipidy slouží nejen jako hlavní antigeny, ale mají i patogenní funkci (Nishida et al., 2012).

Antigenní variace je schopnost mikrobiálních druhů měnit antigenní charakter svých povrchových komponent (vnější membránové proteiny, pili) a vyhnout se tak fagocytóze (Razin et al, 1998). Mykoplasmata mohou spontánně a náhodně generovat různé lipoproteiny s různými antigenními fenotypy, které přežijí hostitelskou reakci schopnou odstranit pouze převládající antigenní typ. Toto náhodné fenotypové spínání může být dosaženo ještě před nástupem specifické imunitní odpovědi. I přes omezené genetické informace, které

mykoplasmata mají se na střídání antigenní povahy jejich buněčného povrchu podílí neočekávaně více genů. Genetické mechanismy antigenní variace lze rozdělit do tří kategorií:

- 1) variace podle homopolymerního opakování,
- 2) variace podle chromozomální přestavby,
- 3) variace podle opakování kódujících sekvenčních domén (Rottem, 2003).

Tato schopnost mikroorganismu omezuje efektivní rozpoznání mykoplasmata imunitním systémem hostitele jako cizí struktury a přispívá tak ke zvýšení kolonizace hostitelských tkání (Razin et al., 1998). Mikroorganismy jsou antigenně podobné hostitelským buňkám a tento fenomén se také nazývá jako biologické mimikry. Některé druhy mykoplasmata mají unikátní polární organely ve tvaru výběžků, které se uplatňují při kontaktu bakterie s hostitelskou buňkou (Svoboda et al., 1996).



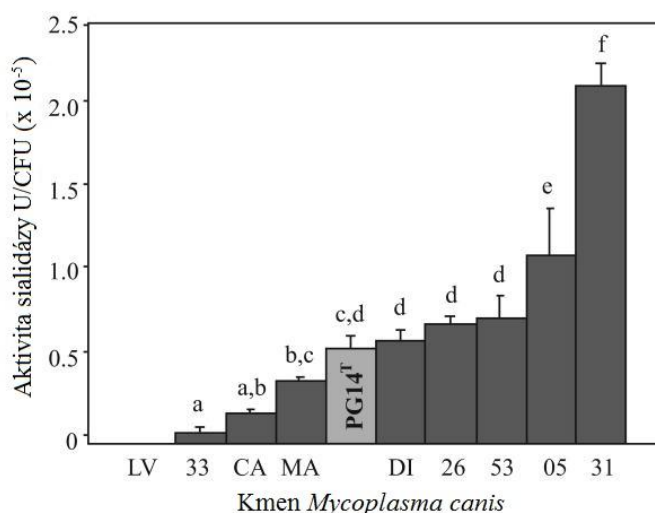
Obrázek 4: Schéma struktury amino-konce bakteriálních lipoproteinů (Rottem, 2003)

- I) mykoplasmatický lipoprotein bez N-acylovaného aminoterminálního cysteinylového zbytku,
- II) lipoprotein z *Escherichia coli* s N - acylovaným cysteinylovým zbytkem.

O faktorech virulence psích mykoplasmata se ví velmi málo (Chalker, 2005). Bakterie neprodukují silné toxiny, jsou známy pouze mírně toxické vedlejší produkty jejich metabolismu jako je peroxid vodíku či peroxidové radikály (Razin, 1978). Blízký kontakt mykoplasmata s membránou hostitelské buňky vytváří mikro-prostředí, které usnadňuje hromadění těchto produktů metabolismu mykoplasmata a tím peroxidové radikály způsobují oxidační poškození hostitelské buněčné membrány (Razin a Jacobs, 1992; Razin, 1978). Peroxid vodíku je konečný produkt dýchání mykoplasmata. Velká část peroxidu vodíku, který bakterie produkují, je zničena činností katalázy a peroxidázy hostitele. Pro uplatnění

toxického účinku peroxidu musí mykoplasmata přilnout na povrch hostitelské buňky. V dostatečné koncentraci poté může peroxid způsobovat přímé poškození buněčné membrány, jako je například lipidová peroxidace (Razin, 1978). Dalším významným faktorem jsou adheziny, které hrají hlavní roli v cytoadhezi (Razin et al., 1998). Adheze mykoplasmat na hostitelské buňky je nezbytným předpokladem pro kolonizaci a vznik infekce (Razin a Jacobs, 1992). Tento proces zahrnuje také řadu doplňkových membránových proteinů, které usnadňují boční pohyb a koncentraci molekul adhezinu pro upevnění hrotu organely (Razin et al., 1998). Ztráta adheze způsobená mutací vede ke ztrátě infekčnosti (Razin a Jacobs, 1992).

Mezi faktory virulence patří i enzym sialidáza. V rámci širšího průzkumu rodu *Mycoplasma* byla snaha odhalit přítomnost sialidázové aktivity u primárně a oportunně patogenních mykoplasmat, která se dříve považovala za velmi vzácný faktor virulence mezi mykoplasmaty. Sialidázová aktivita byla popsána u jedenácti druhů a z toho byla evidentní u třech psích druhů: *M. canis*, *M. cynos* a *M. morale* (Berčič et al., 2012). Specifická aktivita se pohybovala v rozmezí od $5,2 \pm 0,8 \times 10^{-6}$ do $1,1 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ U/CFU (enzymových jednotek na kolonie tvořící jednotky). Ostatní druhy izolované od psa nevykazovaly ať už secernovanou nebo buněčně spojenou sialidázovou aktivitu. Toto je první zpráva o bakteriálním faktoru virulence, jehož exprese se liší mezi kmeny určitých druhů mykoplasmat, které se vyskytují u psů. Bylo zkoumáno devět klinických izolátů *M. canis* na rozsah vnitrodruhové variability v aktivitě sialidázy [obr. 5]. Kmen LV neměl žádnou aktivitu naopak kmen 31 měl sialidázovou aktivitu nejvyšší (May a Brown, 2009).



Obrázek 5: Vnitrodruhová variace sialidázové aktivity *Mycoplasma canis* (May a Brown, 2009).

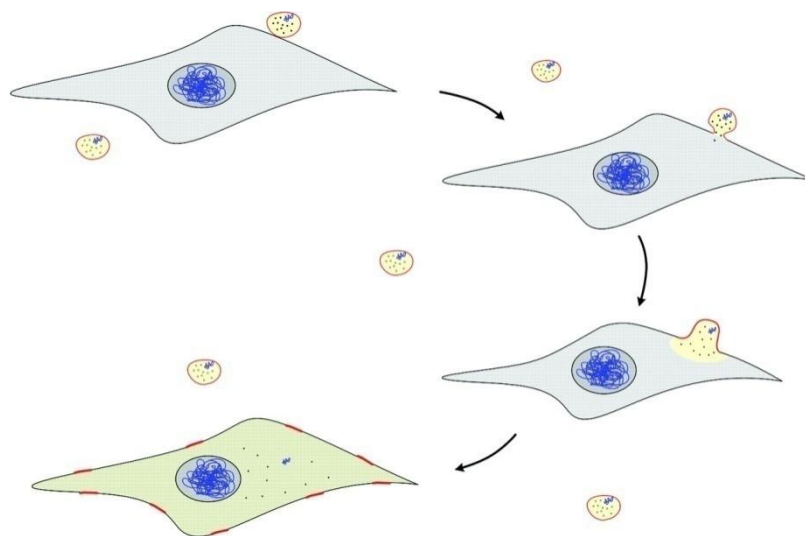
Enzym sialidáza podporuje mikrobiální kolonizaci, invazi tkání a pomáhá šíření bakterie v hostiteli, tak že poškozují hostitelské molekuly, které reagovaly s kyselinou sialovou, povrch buněk a extracelulární matrix (May a Brown, 2009). Enzym může vyvinout přímý toxický účinek na hostitelské buňky, stejně jako může zasahovat do obranného mechanismu hostitele. Předpokládá se, že činnost sialidázy u některých mykoplasmat je potřeba k využití zbytků kyseliny sialové k připevnění k hostitelským epiteliálním buňkám (Priestnall et al., 2014).

2.6 Patogeneze

Podobně jako i jiné skupiny mikroorganismů mohou mykoplasmata existovat na povrchu sliznic jako součást normální bakteriální flóry v horních dýchacích cestách psů (Hong a Kim, 2012). Zjistilo se, že až u 27 % zdravých psů byly plíce kolonizovány (Chalker et al., 2004). Avšak kolonizace virulentními druhy má za následek vznik onemocnění, především dojde-li k poruše nebo poranění tkáně hostitele. Míra patogenního vlivu mykoplasmat na hostitelské tkáně se výrazně liší a závisí na typu mikroorganismu i na druhu postiženého orgánu (Svoboda et al., 1996). Ke kolonizaci sliznic, kterou umožňují adhezivní struktury, může docházet aspirací či pohlavním stykem (Vařejka et al., 1989). Přenos *M. cynos*, jenž je původcem pneumonie u psů, je nejčastěji kapénkami z nosního či očního sekretu a slinami. Chalker et al. (2004) uvádí, že v průběhu jejich vyšetřování byl *M. cynos* jediný druh mykoplasmat izolovaný ze vzduchu v psím kotci. Určitou představu o tom, jak tyto bakterie mohou způsobovat onemocnění a jak se šíří v rámci psího hostitele, poskytla nedávná identifikace sialidázové aktivity *M. cynos* (Priestnall et al., 2014).

K invazi do krevního řečiště a tkání dochází zřídka. Kolonizují epiteliální buňky respiračního a urogenitálního traktu nakažených zvířat, proto jsou považovány za povrchové (extracelulární) parazity (Razin, 1978). Mykoplasmata vyvolávají chronické i celý život trvající infekce. To je zapříčiněno jejich schopností obejít obranné mechanismy hostitele. Některé druhy mají schopnost se navazovat na membrány hostitelských buněk, čímž se chrání před určitými obrannými mechanismy, například jako je fagocytóza či mukociliární clearance (Svoboda et al., 1996). U nepostřehnutelných infekcí je známo, že ovlivňují fyziologické mechanismy i imunitní systém. Mění jak počet, tak i distribuci subpopulace lymfocytů a indukuje zvýšení hladiny aktivity NK buněk, potlačuje humorální protilátkovou odpověď a zvyšují produkci TNF, IL-1, IL-6 a INF (Hong a Kim, 2012). Absence pevné buněčné stěny umožňuje přímý kontakt bakterie s cytoplazmatickou membránou hostitelské buňky a to může

vést k buněčné fúzi [obr. 6]. Fúzní aktivitu můžeme nalézt u mykoplasm, které vyžadují pro růst esterifikovaný cholesterol (Rottem, 2003).



Obrázek 6: Schéma fúze mykoplasm s eukaryotickou buňkou (Rottem, 2003).

Hlavními mechanismy obcházení imunitního systému hostitele jsou molekulární mimikry a fenotypová plasticita. Molekulární mimikry odkazují na antigenní epitopy, které jsou různé pro druhy rodu *Mycoplasma* a podílejí se na obcházení obranných mechanismů hostitele a/nebo indukují protilátky, které se vyskytují při mykoplasmových infekcích. Zmíněná fenotypová plasticita je schopnost jednoho genotypu změnit jeho antigenní povahu a produkovat více než jednu alternativní formu. Fenotypová plasticita může být dosažena dvěma mechanismy a to v reakci na signály životního prostředí nebo náhodné změny v expresi jednoho nebo více genů (Rottem, 2003).

Nedávná studie *M. cynos* ukázala, že tento druh má hemaglutinující protein HapA, který umožňuje aglutinaci nejen psích erytrocytů. Kromě toho se může HapA vázat na receptory, které obsahují zbytky kyseliny sialové. Je také zajímavé, že *M. cynos* syntetizuje neuramidázy, které mohou odstranit zbytky kyseliny sialové na glykoproteinech a tím i uvolnit mykoplasmata z vazby na tyto receptory (Kastelic et al., 2015).

2.7 Biochemické vlastnosti

Rosendal (1973) otestoval *M. spumans*, *M. canis*, *M. maculosum*, *M. edwardii* a 11 kmenů *M. cynos*. Zjistil, že všechny kmeny nehydrolyzují močovinu. *M. canis*, *M. edwardii* a všech 11 kmenů *M. cynos* fermentují glukózu, způsobují hemolýzu erytrocytů, ale nehydrolyzují arginin. Všechny kmeny kromě *M. spumans* redukuje tetrazolium

anaerobně. Aerobní redukce tetrazolia byla pozitivní jen u 4 kmenů *M. cynos*. Biochemické vlastnosti a konkrétní druhy jsou shrnuty v tabulce 2 (Rosendal, 1973; Tully a Razin, 1983). Produkce fosfatázy se prokázala u všech druhů kromě *M. canis* PG14, *M. edwardii* PG24, *M. molare* H542, *M. gateae* H372 a *M. arginini* G320 (Tully a Whitcomb, 1979).

Tabulka 2: Biochemické vlastnosti vybraných druhů mykoplasmat (Rosendal, 1973).

Kmen	Fermentace glukózy	Hydrolyzá argininu	Produkce fosfatázy	Redukce tetrazolia (aerobní/anaerobní)	Hemolýza morčecích ery
<i>M. spumans</i> PG 13	-	+	+	-/-	-
<i>M. canis</i> PG 14	+	-	-	-/+	+
<i>M. maculosum</i> PG 15	-	+	+	-/+	-
<i>M. edwardii</i> PG 24	+	-	-	-/+	+
<i>M. cynos</i> H 831	+	-	+	-/+	+
<i>M. cynos</i> H 772	+	-	+	+/+	+
<i>M. cynos</i> H 613	+	-	+	-/+	+
<i>M. cynos</i> H 611	+	-	+	-/+	+
<i>M. cynos</i> H 751	+	-	+	+/+	+
<i>M. cynos</i> H 752	+	-	+	-/+	+
<i>M. cynos</i> H 754	+	-	+	-/+	+
<i>M. cynos</i> H 432	+	-	+	+/+	+
<i>M. cynos</i> H 242	+	-	+	-/+	+
<i>M. cynos</i> H 442	+	-	+	-/+	+
<i>M. cynos</i> H 713	+	-	+	+/+	+

3 Onemocnění u psů vyvolané mykoplasmaty

Mykoplasmata kolonizují nejen sliznice dýchacího a genitálního traktu mnoha zvířat, ale mohou způsobovat i mastitidy, zánět spojivek, artritidy či méně častěji potraty (Chalker et al., 2004; Hong a Kim, 2012). Často kolonizují horní dýchací cesty, méně pak tracheu a dolní cesty dýchací. Mykoplasmata byly také detekovány v izolátech z pohlavního aparátu fen, hlavně z vagíny a děložního krčku, vzácně však z dělohy. Tyto bakterie byly izolovány více z prepucia u psů s balanopostitidou než u zdravých jedinců a signifikantně méně z prostaty (Svoboda et al., 1996). Termínem psí mykoplasmata jsou označovány druhy, které se vyskytují pouze u psů nebo jsou často izolovány od psů a zřídka od jiných hostitelů. Hlavní druhy psích mykoplasmat jsou zahrnuty v tabulce 3 (Chalker, 2005).

Tabulka 3: Druhy mykoplasmat vyskytující se u psů (Chalker, 2005).

Druh	Kmen	Hostitel
<i>A. laidlawii</i>	PG8	různé
<i>M. arginini</i>	G230	pes, koza, kočka, ovce
<i>M. bovigenitalium</i>	PG11	skot, pes
<i>M. canis</i>	PG14	skot, pes, člověk
<i>M. cynos</i>	H831	pes
<i>M. edwardii</i>	PG24	pes
<i>M. feliminutum</i>	Ben	pes, kočka
<i>M. felis</i>	CO	pes, kůň, kočka, člověk
<i>M. gateae</i>	CS	pes, kočka
<i>M. maculosum</i>	PG15	pes
<i>M. molare</i>	H542	pes
<i>M. opalescens</i>	MH5408	pes
<i>M. sp. HRC689</i>	HRC689	pes
<i>M. sp. VJC358</i>	VJC358	pes
<i>M. spumans</i>	PG13	pes
<i>U. canigenitalium</i>	D6P-C	pes

3.1 Infekce respiračního traktu psů

Mykoplasmata jsou u psů považovány za součást normální bakteriální flóry horních dýchacích cest, přesto existují i protichůdné zprávy o přítomnosti mykoplasmat v dolních dýchacích cestách zdravých psů (Chalker et al., 2004). Avšak pouze u 20 - 25 % zdravých psů jsou mykoplasmata přítomna v průdušnicích či plicích a vzácně se vyskytují na sliznici spojivkového vaku (Chalker, 2005). Naopak velice často jsou izolovány z nosní, ústní, faryngeální i laryngeální sliznice (Svoboda et al., 1996). Plíce psů jsou mykoplasmaty kolonizovány při zápalu plic. Mykoplasmata byly izolovány ze 78 % psů mladších jednoho roku s plicním onemocněním (Chalker, 2005).

Psí respirační onemocnění CIRDC je komplexní onemocnění, zahrnující řadu patogenů, které pokud jsou přítomny současně, mohou působit synergicky a zvyšovat závažnost onemocnění. Mezi infekční agens, které jsou běžně spojovány s CIRDC patří psí adenovirus typu 2 (CAV-2), bakterie *Bordetella bronchiseptica*, virus psí parainfluenzy, *Streptococcus equi* subs. *zooepidemicus* a dále také psí respirační koronavirus (CRCoV), pneumovirus (CnPnV) či bocavirus (CBoV) (Decaro et al., 2016; Chalker et al., 2004). Výskytem těchto infekčních agens se zvyšuje i pravděpodobnost kolonizace dýchacích cest mykoplasmaty. Jejich přítomnost je také spojena se septickým zánětem a předpokládá se, že mykoplasmata mohou kolonizovat plíce při pneumonii nebo v souvislosti s imunosupresivními účinky CDV (virus psinka) nebo jiných virových agens (Chalker, 2005; Chvala et al., 2007). Ohniska CIRDC jsou častější a závažnější u psů, kteří jsou umístěni ve společných vzdělávacích institucích (Chalker et al., 2004).

Role jednotlivých druhů mykoplasmat při respiračních infekcích psů není zcela objasněna. Od psů s CIRDC byly izolovány *M. bovis genitalium*, *M. canis*, *M. cynos*, *M. edwardii*, *M. feliminutum*, *M. gateae*, a *M. spumans* (Hong a Kim, 2012). Nicméně, *M. cynos* je jediný druh mykoplasmat, který je běžně spojován s onemocněním dýchacích cest psů (Chvala et al., 2007). Poprvé bylo izolováno z plic psa s klinickým zápalom plic v roce 1972 (Priestnall et al., 2014). *M. cynos* bylo také izolováno z ohniska enzootické pneumonie psů žijících v kotci, kdy byli dva zdraví psi vystaveni infikovanému vrhu. Tímto bylo prokázáno, že *M. cynos* indukuje zápal plic se závažným zánětem tkáně průdušek a dýchacích cest (Hong a Kim, 2012). Priestnall et al. (2014) uvádí další výskyt *M. cynos* u několika případů CIRDC ve vrhu mladých štěňat zlatého retrievera a u psů plemene pinč s pneumonií způsobenou současnou infekcí *M. cynos*, psinky a CAV-2. Kromě toho byl druh *M. cynos*

jako jediný z rodu *Mycoplasma* prokázán při vypuknutí závažné bronchopneumonie ve vrhu mladých štěňat beagů, která vyústila v několik úmrtí. U zbylých přežívajících štěňat to bylo vyřešeno podáním vhodných antibiotik (Hong a Kim, 2012).

Stanovení klinických příznaků infekce spojené s *M. cynos* je velice obtížné, neboť tato bakterie je často izolována od psů, kteří jsou současně infikováni dalšími patogeny, zejména viry. Patologické změny související s izolací *M. cynos* zahrnují hrubě hmatatelné konsolidace plic, ztrátu řasinek na průduškách a bronchiolárních epitelových buňkách, nižší stupeň serofibrinózního zánětu pohrudnice, těžkou akutní katarální - hnisavou a hemoragickou nebo fibrin nekrotizující bronchopneumonii s infiltrací lymfocytů. Dále je také mezi patologické změny zahrnuta hyperplazie, plicní edém, výpotek z neutrofilů a makrofágů do alveolárních prostorů a exfoliace pneumocytů typu II. Dosud nebylo objasněno, zda výše popsané patologické změny jsou důsledkem infekce *M. cynos* nebo se jedná o společné působení více mikroorganismů (Priestnall et al., 2014). Bylo zjištěno, že *M. cynos* přetrvává v plicích po dobu až 3 týdnů po infekci, a kromě plic může být izolováno také z průdušnic, spojivky i mandlí (Hong a Kim, 2012). Schopnost této bakterie přetrvávat ve vnějším prostředí není zcela vysvětlena. Hong a Kim (2012) se domnívají, že vytvořením biofilmu v psích kotcích by mohlo dojít k zajištění vhodných podmínek pro přežití *M. cynos* mimo tělo hostitele. *M. cynos* může být izolováno ze vzduchu, avšak doba jeho přežití ve vnějším prostředí není známá. Přežití jiných druhů mykoplasm se pohybuje od jednoho týdne do několika měsíců (Mannering et al., 2009).

3.2 Infekce urogenitálního traktu

První mykoplasma bylo z psího pohlavního ústrojí izolováno v roce 1951. Studie zdravých psů poté prokázaly, že mykoplasmata mohou být součástí normální mikroflóry dolního genitálního traktu u psů, odkud se mohou dostávat i do močových cest (Doig et al., 1981; Svoboda et al., 1996). Mykoplasmata se v pohlavním ústrojí vyskytují u 30 - 50 % psů a 23 - 75 % fen (Chalker, 2005). Tyto bakterie se často izolují z moči psů s onemocněním močových cest a běžné jsou i smíšené infekce, kdy se mykoplasmata vyskytují společně s jinými bakteriemi (Chalker, 2005; Svoboda et al., 1996). Vznik mykoplasmových infekcí podporují predispoziční faktory jako je například nádorové onemocnění nebo močové kameny (Svoboda et al., 1996).

M. canis je považováno za oportunní kofaktor onemocnění jak dýchacích cest tak i urogenitálního traktu. Poprvé bylo *M. canis* PG14^T izolováno z hrdla zdravého psa a další kmeny jako UF31, UF33, LV, 5, 26, Cal a Mara byly izolovány z vaginálních výtěrů fen (Michaels et al., 2016). *M. canis* se vyskytuje ve vzorcích od fen s endometritidou. Častý nález mykoplasmat je prokazován ve vaginálních vzorcích, prepuciálních výtěrech a ejakulátů. Psi s poruchami plodnosti měli ve vzorcích více ureaplasmat než zdraví psi. Méně často jsou mykoplasmata prokazována ve vzorcích z biopsie rekta či tlustého střeva psů s kolitidou, ale dosud nebylo prokázáno, zda jsou původci onemocnění. Běžně jsou izolovány i z tkáně prostaty, kam se zánět rozšířil z močových cest či močového měchýře se zánětem (Greene, 2012; Smith, 2008; Svoboda et al., 1996). Doig et al. (1981) oznámil, že kmeny *M. canis* způsobují zánět varlete a nadvarlete a hnisavý zánět endometria.

Při studiích byly mykoplasmata izolována asi z 88 % vzorků od fen. Nejvíce zastoupeno bylo *M. canis*, poté *M. maculosum*, *M. spumans*, *M. edwardii*, *M. cynos* a *M. molare*. Přibližně polovina mykoplasmat izolovaných u fen se objevila i ve smíšené kultuře. Od klinicky abnormálních psů byla míra izolace mykoplasmat mírně vyšší, stejně jako u fen. Avšak s rozdílem, že výskyt byl mezi zdravými a neplodnými psy statisticky významnější. Rozdíly byly také ve frekvenci izolace různých druhů mykoplasmat. Stejně jako u fen bylo nejvíce izolováno *M. canis*, poté se frekvence izolace ostatních druhů mykoplasmat odlišuje. Druhým nejčastěji izolovaným bylo *M. cynos*. Ostatní druhy mykoplasmat (*M. maculosum*, *M. spumans*, *M. edwardii* a *M. molare*) byly u psů méně běžné než u fen (Doig et al., 1981).

3.3 Hemoplasmové infekce

Mykoplasmata způsobující anémie se označují jako hemotropní mykoplasmata neboli hemoplasmata. Dříve známé jako *Haemobartonella* a *Eperythrozoon* byly na základě analýzy sekvence 16S rRNA zařazeny do rodu *Mycoplasma* a přejmenovány. Nově popsané hemoplasmata mají označení „*Candidatus*“ (Messick, 2004; Willi et al., 2010).

Hemoplasmata jsou obligátní bakterie erytrocytů, které infikují mnoho druhů savců po celém světě a mohou vyvolávat anémii u infikovaného hostitele. Vážou se na povrch červených krvinek, ale za určitých podmínek jsou schopny vniknout i do hostitelské buňky (Messick, 2004). Od psů byly izolovány tři hemoplasmata. První v roce 1928 *M. haemocanis* (Mhc) a v roce 2004 bylo objeveno ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ (CMhp) (Biondo et al, 2009; Compton et al., 2012; Sykes et al, 2005). *M. suis* bylo poprvé hlášeno v roce 2016

(Mascarelli et al., 2016). Předpokládaným vektorem přenosu těchto mikrobů jsou krev sající členovci hlavně piják hnědý (*Rhipicephalus sanguineus*). K infekci může docházet prostřednictvím infikované krve při krevní transfuzi nebo při psích zápasech, kdy dochází k pokousání psů (Cannon et al., 2016; Wardrop et al., 2005; Warman et al., 2010; Willi et al., 2010). Rizikovými faktory pro vznik hemoplasmových infekcí jsou vyšší věk psa, samčí pohlaví a venkovská lokalita, kde psi žijí v boudách. Dalším rizikovým faktorem by mohla být i smíšená rasa psa, kdy křížení psi byli mnohem častěji postiženi hemoplasmovou infekcí než čistokrevní psi. Avšak tento faktor není zcela potvrzen, protože většina těchto psů žila i zároveň v boudách (Aquino et al., 2016; Novacco et al., 2010; Soto et al., 2017).

M. haemocanis je epitelární parazit erytrocytů, který způsobuje akutní, těžkou anémii. Ta je typická u imunosuprimovaných psů nebo u psů, kteří prodělali splenektomii. Předběžné zprávy také naznačují, že *M. haemocanis* může být patogenní i pro zdravé psy se slezinou, u kterých však může infekce proběhnout bez příznaků (Messick, 2004; Sykes et al., 2005; Warman et al., 2010). ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ se více objevuje u chudokrevných psů po splenektomii, kteří podstoupili chemoterapii kvůli leukemii (Barker et al., 2010).

M. suis bylo poprvé v krvi psů nalezeno a zařazeno mezi hemotropní mykoplasmata v roce 2016. Bylo identifikováno pomocí amplifikace DNA a sekvencování pouze ze dvou psů z Roldánu v Sante Fe v Argentině. Jeho prevalence je proto velice nízká a to 2,9 %. Studie výskytu hemoplasm u psů v Argentině upozorňuje na nebezpečnost, kterou tyto bakteriální patogeny představují nejen pro domácí zvířata, ale díky jejich potenciální zoonotické povaze, i pro člověka (Mascarelli et al., 2016).

V řadě případů jsou psi hemoplasmata spojována s imunitní reakcí zprostředkované hemolytickou anémií (IMHA), ale doposud žádná studie nepotvrdila, zda je souvislost mezi těmito mykoplasmaty a IMHA pravdivá. Infekce způsobená hemoplasmaty je tedy obvykle závislá na dalších faktorech jako je potlačení imunity, souběžné infekce či splenektomie, což naznačuje, že infekce může být u některých psů latentní a také může vyvolávat subklinické anémie (Varanat et al., 2011; Warman et al., 2010).

Klinické projevy hemoplasmových infekcí závisí na stavu psa, zda žije ve stresových podmínkách, má sníženou imunitu nebo prodělal splenektomii. Hematologická vyšetření se mohou lišit v závislosti na stádiu infekce. V akutní fázi onemocnění se běžně nalézají anémie,

anizocytóza, polychromazie, sférocytóza, retikulocytóza, Howell-Jollyho tělíška, echinocytóza a je pozitivní Coombsův test. Vyskytuje se také leukopenie, neutropenie nebo leukocytóza. Při chronických infekcích se mohou vyskytovat hematologické abnormality jako mírná anémie a leukopenie (Soto et al., 2017).

Hemoplasmata mají celosvětovou distribuci. Molekulární prevalence se pohybuje v rozmezí od 0,48 % do 44,7 % pro *M. haemocanis* a od 0,3 % do 33,3 % pro ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ (Soto et al., 2017). Studie prováděné v USA ukázaly, že prevalence hemoplasmat v populaci psů v této lokalitě je velmi malá 1,3 % (*M. haemocanis* 0,6 % a ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ 0,7 %). Malá prevalence je také v Austrálii 1,3 %, Švýcarsku 1,2 % či Maďarsku 1,2 %. Vyšší prevalence hemoplasmových infekcí u psů je například ve Francii 15,4 %, Itálii 9,5 %, Španělsku 14,9 %, Řecku 10,6 %, Indii 12,2 %, Kambodže 12,8 %, Thajsku 19,9 %, Tanzanii 20 % či Íránu 23 %. Výrazně vyšší prevalence je pouze ve čtyřech zemích a to v Portugalsku 40 %, Súdánu 42,3 %, Gabonu a Brazílii, kde je prevalence 44,7 % (Compton et al., 2012; Kaewmongkol et al., 2017; Novacco et al., 2010; Soto et al., 2017).

V několika zemích byla také stanovena molekulární prevalence ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ - v Brazílii, kde byla prevalence 7,5 %, ve Francii 9,6 %, Španělsku 0,6 %, Itálii 5 %, Švýcarsku 0,3 %, východním Súdánu 33,3 %, Argentíně 31,4 % a Tanzanii 1 %. Prevalence *M. haemocanis* je v Brazílii 1,4 %, Francii 3,3 %, Španělsku 14,3 %, Švýcarsku 0,9 %, východním Súdánu 9 %, Argentíně 48,6 %, Tanzanii 19 %, Itálii 3,7 % a Portugalsku 20 % (Compton et al., 2012; Inokuma et al., 2006; Roura et al., 2010).

Velké rozdíly prevalence hemoplasmat v různých oblastech světa mohou souviset s klimatickými podmínkami a s výskytem či absencí klíštěte, který hemoplasmata přenáší (Barker et al., 2010; Novacco et al., 2010). V Evropě je klíště nalézáno především v oblastech Středomoří a jižní Francie. Naproti tomu se piják hnědý téměř nevyskytuje ve Švýcarsku díky chladnému podnebí a to potvrzuje velice malá prevalence psích hemoplasmových infekcí. Hemotropní mykoplasmata se mohou dostávat do zemí ve kterých se nevyskytuje klíště tak, že tam jsou dovezeni infikovaní psi z jiných zemí například z Itálie, Španělska nebo Mexika (Wengi et al., 2008).

Chronické, subklinické hemoplasmové infekce jsou typické pro imunokompetentní psy a méně častěji se objevují u terapeuticky nebo rakovinou vyvolaných

imunokompromitovaných psů. Tyto infekce by pak mohly rozvíjet příznaky hemolytické anémie u psů po splenektomii (Compton et al., 2012; Sykes et al., 2005). Je také podezření, že psi infikovaní hemoplasmaty mohou zůstat chronickými nosiči (Wengi et al., 2008).

Hemoplasmové infekce byly zjištěny i u psů, kteří se účastnili psích zápasů hlavně na území USA. '*Candidatus M. haematoparvum*' bylo zjištěno u 32 % bojových psů a *M. haemocanis* u 30 %. Vysoký výskyt nejen mykoplasmových infekcí je důsledkem toho, že bojovní psi dostávají obvykle minimální preventivní zdravotní péči. Nejčastější bojové psí plemeno je pitbul. Právě tato rasa a psí zápasy jsou známé rizikové faktory pro vznik hemoplasmových infekcí. U bojových psů se málokdy vyskytují klíšťata, a proto se předpokládá vertikální přenos bakterií případně přenos prostřednictvím krve nebo slin při kousnutí (Cannon et al., 2016).

3.4 Infekce CNS

Granulomatózní meningoencefalomyelitida (GME) a nekrotizující meningoencefalitida (NME) jsou progresivní často fatální onemocnění centrálního nervového systému (CNS) psů. Charakteristické pro tyto nemoci je hnisavý zánět a průvodní neuropatologické změny. Avšak faktory, které přispívají k rozvoji a patogenezi onemocnění, jsou nejasné. Etiopatogeneze je multifaktoriální a pravděpodobně přispívají i genetické predispozice a faktory životního prostředí. Při vyšetření mozkové tkáně psů bylo *M. canis* identifikováno s použitím PCR a kulturačního vyšetření u 80 % případů s GME a 50 % s NME. Nicméně *M. canis* je běžně spojován s respiračním či urogenitálním onemocněním psů a toto je první zpráva o tom, že *M. canis* je spojováno s onemocněním CNS. Avšak význam *M. canis* identifikovaného u GME a NME je nejasný, nevylučuje se i možnost kontaminace vzorků. Průnik mykoplasmat do CNS má za následek hnisavý zánět, což není typické pro GME a NME (Barber et al., 2012).

M. edwardii bylo izolováno od šesti týdenní samice s hnisavou meningoencefalitidou (Greene, 2012). Pro usmrcení byla zvolena euthanasie a poté byla fena podrobena pitvě. Bilaterálně v plicním parenchymu byly přítomny skvrnitě oblasti. Na pravé straně hlavy nad okem byla subkutánní červená část v průměru asi 2 cm, která nekomunikovala s povrchem kůže. Lebka byla mírně pokleslá podél linie lebečního švu mezi pravou čelní a pravou temenní kostí. Avšak nebyly nalezeny žádné důkazy o zlomenině lebky. Ve stejné oblasti, kde byla lebka pokleslá, měla fena podkožní zánětlivé léze. Na povrchu leptomeninges celého

mozku, zejména na základně a uvnitř komorového systému bylo pozorováno menší množství hustého žlutozeleného hnisu [obr. 7] (Ilha et al., 2010).

Bylo provedeno histopatologické vyšetření fixovaných a obarvených tkání. Rutinní aerobní a anaerobní kultivační vyšetření bylo prováděno z čerstvých vzorků tkání. Po 48 hodinové inkubaci byly získány kolonie. Polymerázová řetězová reakce poskytla pozitivní výsledek mozkové tkáně na mykoplasmata z 99 % identická s *M. edwardii*. Pronikavé rány v kůži v blízkosti lebky by mohly být původní místo inokulace *M. edwardii*. Tato studie je první, kdy bylo zjištěno, že *M. edwardii* způsobilo meningitidu u psa (Ilha et al., 2010).



Obrázek 7: Hnisavý výpotek na spodině lebeční (Ilha et al., 2010).

Původní místo izolace *M. edwardii* byla ústní dutina. Později bylo *M. edwardii* izolováno z mnoha dalších orgánů jako například z průdušnice, hltanu, děložního čípku, prostaty, předkožky, vaginy, nosní dutiny i lymfatických uzlin. Bylo také objeveno v plicích 19 % zdravých psů, v mandlích 42 % zdravých psů a pouze u 10 % psů s respiračním onemocněním. *M. edwardii* bylo izolováno též od psa s akutní polyartritidou a septikémií, která se vyvinula po chirurgickém zákroku (Ilha et al., 2010).

4 Laboratorní diagnostika

4.1 Vyšetřovaný materiál

Klinický materiál se odebírá dle druhu onemocnění, vždy před léčbou antibiotiky. Mykoplasmata jsou křehká a citlivá, je nutné dbát na správný a šetrný odběr. K vyšetření jsou vhodné výtěry ze sliznice nosní, spojivkové či urogenitálního traktu. Pro vyšetření lze použít i sputum, synoviální tekutinu, sperma či moč (Quinn et al., 1994; Svoboda et al., 1996; Zambor et al., 1990). Materiál se odebírá do speciálního transportního média, uchovává se v chladu a musí být co nejrychleji zpracován. Při transportu delším jak 24 hodin, je nezbytné vzorky zasílat na suchém ledu (Bednář et al., 1996; Greene, 2012; Quinn et al., 1994; Svoboda et al., 1996; Tully a Razin, 1983).

Při zpracování vzorků do 24 hodin mohou být uchovávány při teplotě +4 °C. Pokud je materiál třeba uchovat déle, vzorek se zmrazí na teplotu -70 °C (Zambor et al., 1990).

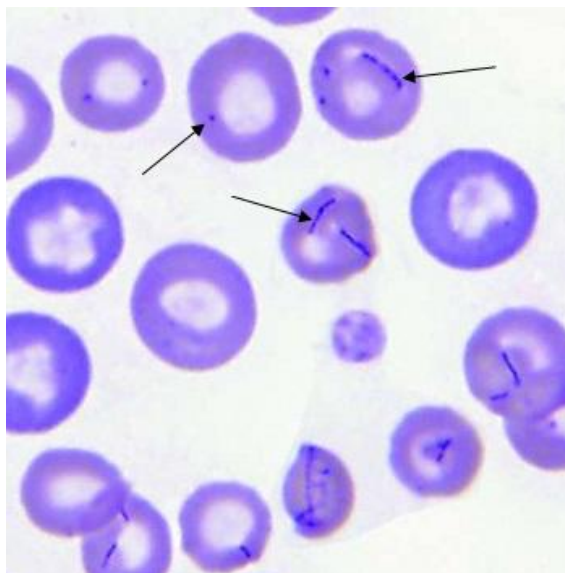
4.2 Přímá diagnostika

4.2.1 Mikroskopie

Mykoplasmata díky své malé velikosti nelze detekovat světelným mikroskopem (Rivera a Cedillo, 2015). Mikroorganismy lze vizualizovat negativním barvením a použitím transmisivní elektronové mikroskopie (Greene, 2012). Výjimkou jsou hemotropní mykoplasmata. Historicky byly hemoplasmata diagnostikovány světelným mikroskopem na základě cytologického zhodnocení krevního nátěru, v němž se zobrazovaly jako malé, bazofilní koky vyskytující se jednotlivě či v řetězcích na povrchu erytrocytů [obr. 8]. Tato technika nebyla pro diagnostiku hemoplasmat moc spolehlivá, protože po delší době v EDTA ztrácí životaschopnost (Compton et al., 2012; Messick, 2004).

4.2.2 Biochemické testy

Detekce mykoplasmat může být prováděna biochemickými testy. Mezi sledované vlastnosti patří fermentace glukózy či hydrolýza argininu a močoviny (viz. 2.7). V běžné diagnostice se dává více přednost sérologickým testům (Vařejka et al., 1989).



Obrázek 8: Krevní nátěr psa s *Mycoplasma haemocanis* (Messick, 2004).

4.2.3 Kultivační vyšetření

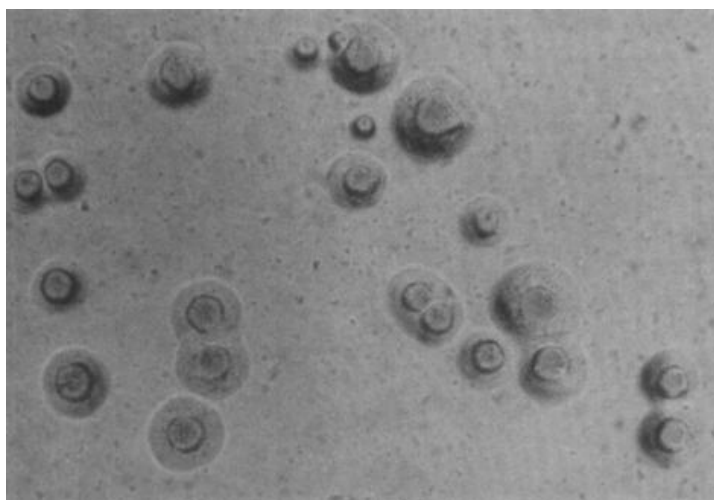
Mykoplasmata jsou kultivačně velmi náročná. Díky své omezené biosyntetické schopnosti potřebují k růstu bohatou půdu se specifickými růstovými faktory a přirozenými živočišnými bílkovinami. Rostou pouze na isotonickém či hypertonickém médiu se sorbitolem nebo sacharosou. Vícesložkové médium by mělo obsahovat zdroj aminokyselin, steroly, prekurzory nukleových kyselin i vitamíny. Důležitý je komplex vitamínů B pro jejich růst (Demina et al., 2011; Greenwood et al., 1999; Quinn et al., 1994; Schlegel a Zaborosch, 1993).

Základní kultivační půdou pro pěstování mykoplasmat je kvalitní hovězí extrakt se suplementy neboli PPLO médium. Nejčastěji se používají PPLO agary či bujóny. Používaná voda pro přípravu média by se měla shodovat s kvalitou vody pro tkáňové kultury. Zdrojem potřebného cholesterolu je v médiu obvykle koňské sérum. Sérum dodává nejen cholesterol, ale i nenasycené a nasycené mastné kyseliny, které jsou potřeba pro syntézu membrány. Do půdy se dále přidává kvasničný extrakt, který obsahuje prekurzory nukleových kyselin. Součástí média mohou být i antibiotika například penicilin pro potlačení růstu gram-pozitivních bakterií či octan thalný, který inhibuje plísně a gram-negativní bakterie. Snadnější záchyt mykoplasmat se může zajistit přidáním vhodného substrátu (glukózy, argininu či močoviny) a indikátoru, který změni barvu při růstu mykoplasmat. Indikátorem většinou bývá fenolová červeň. Pro spolehlivější výsledky je vhodnější agar nalít do skleněné Petriho misky, protože byl zpozorován špatný růst mykoplasmat při použití plastových misek. Půda také není vždy standardní, protože různé várky složek mohou mít různou schopnost podporovat růst (Greenwood et al., 1999; Quinn et al., 1994).

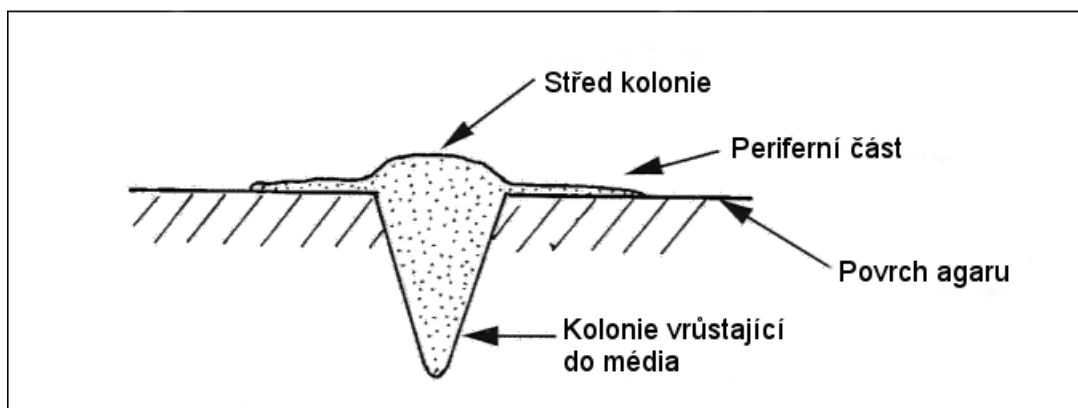
Mykoplasmata jsou fakultativně anaerobní mikroorganismy. Avšak v primokultuře často rostou lépe za anaerobních podmínek. Inkubují se proto ve vlhké atmosféře složené z 5 % CO₂ a 95 % N₂. Vhodná je také duplicitní inkubace aerobně. Optimální teplota pro jejich růst je 36°- 38°C a konečné pH by mělo být v rozmezí 7,2 - 7,8 (Parker a Duerden, 1993; Quinn et al., 1994; Tully a Whitcomb, 1979). Po 3 - 4 dnech inkubace rostou mykoplasmata na PPLO agaru v koloniích velkých cca 0,5 mm s charakteristickým vzhledem tzv. sázeného vejce [obr. 9]. V tekutých půdách se vyskytují jako nepravidelné, někdy rozvětvené struktury. Na krevním agaru mohou některé druhy mykoplasmat, konkrétně *M. canis* a *M. cynos*, vytvářet hemolýzu. Nehemolytické druhy jsou *M. opalescence*, *M. maculosum* a *M. spumans*. *M. edwardii* hemolýzu může vytvářet, ale i nemusí (Bednář et al., 1996; Parker a Duerden, 1993; Schlegel a Zaborosch, 1993; Vařejka et al., 1989).

Díky malé velikosti kolonií nejsou viditelné pouhým okem a je nutné jejich vzhled hodnotit mikroskopicky při zvětšení 25x až 100x. Pro snadnější vizualizaci mikrokolonií se užívá metoda barvení dle Diense. Střed kolonie vrůstající do média se barví tmavě modře, zatímco periferní část roste na povrchu půdy a barví se světle modře [obr. 10]. Kromě uměle připravených agarů se mykoplasmata mohou kultivovat i ve žlutkovém vaku kuřecích embryí či na tkáňových kulturách (Quinn et al., 1994; Vařejka et al., 1989; Votava et al., 2010).

Hemoplasmata nebyly nikdy úspěšně pěstovány *in vitro* (Compton et al., 2012).



Obrázek 9: Neobarvené kolonie *Mycoplasma cynos* charakteristického vzhledu tzv. sázeného vejce pod mikroskopem (zvětšeno 40x) (Rosendal, 1973).



Obrázek 10: Řez kolonií mykoplasmat rostoucí na agaru (Quinn et al., 1994).

4.2.4 Molekulárně biologické metody

Molekulárně biologické metody, jako je polymerázová řetězová reakce (PCR), jsou stále častěji využívány pro detekci i identifikace mykoplasmat. Citlivost a specifita PCR je mnohem lepší než u kultivace či vyšetření světelným mikroskopem (Cimolai, 2001; Compton et al., 2012). Další výhodou PCR je možnost detekce nejen živých, ale i usmrcených mikroorganismů a výsledky jsou dostupné během jednoho dne (Baczynska et al., 2004; Waites et al., 2005). PCR také může být specificky použita pro určitý druh či kmen patogenu pomocí různých PCR primerů nebo sekvenováním PCR produktů. Nevýhodou testů na bázi PCR jsou potenciální falešně negativní výsledky v důsledku přítomnosti inhibitorů PCR, které nebyly odstraněny v průběhu procesu čištění nukleových kyselin a možnost laboratorní kontaminace vyšetřovaného materiálu, což naopak vede k falešně pozitivním výsledkům. Nevýhody mohou být však minimalizovány použitím vhodných technik, činidel a vhodných kontrol (Maggi et al., 2014).

Diagnostiku mykoplasmat, zejména hemoplasmat, zvýšil vývoj citlivé PCR. Hemoplasmata musely být do příchodu PCR diagnostikovány v krevních nátěrech (viz. 4.2.1) (Compton et al., 2012; Messick, 2004).

Další možností laboratorní diagnostiky mykoplasmat je modifikace PCR neboli Real-time PCR - kvantitativní polymerázová řetězová reakce qPCR. Real-time PCR umožňuje přesnou kvantifikaci nukleových kyselin v komplexní směsi i v případě, že množství vyšetřovaného materiálu je ve velmi nízké koncentraci. Výhodou této metody je práce v uzavřeném systému což eliminuje riziko kontaminace vzorků (Baczynska et al., 2004; Fraga et al., 2008).

4.2.5 Ostatní metody

Specifická identifikace se provádí pomocí antisér proti různým druhům mykoplasmat. Test inhibice růstu RIT je založen na inhibici růstu kultury kolem disku z filtračního papíru impregnovaného specifickou protilátkou. Výsledek tohoto testu se odečítá po 3 - 7 dnech a jako pozitivní se hodnotí zóna inhibice kolem disku s homologním antisérem od velikosti 3 mm (Bednář et al., 1996; Clyde, 1964).

Další metodou je imunofluorescenční test (tzv. epifluorescence), při kterém se značená antiséra aplikují na celé kolonie mykoplasmat (Bednář et al., 1996). Imunofluorescenční techniky jsou vhodné k identifikaci mykoplasmat ve smíšených kulturách (Quinn et al., 1994). Vyhodnocení se provádí fluorescenčním mikroskopem a obarvené kolonie homologním antisérem fluoreskují žlutě. Nevýhodou tohoto testu je velká spotřeba fluoresceinem konjugovaného antiséra, proto se častěji provádí nepřímá fluorescence (Lukáš, 2000).

Metabolismus inhibiční test MIT je další možností určení druhů mykoplasmat pomocí specifických protilátek, které inhibují jejich metabolismus (Lukáš, 2000).

4.3 Nepřímá diagnostika

Nepřímá diagnostika mykoplasmat je založena na průkazu specifických protilátek v krevním séru. Používají se velmi citlivé a specifické metody jako je ELISA, RIA, IHT (inhibice hemaglutinace), které se provádějí na specializovaných pracovištích. Od metody RIA se v dnešní době ustupuje díky velké nákladnosti na potřebné vybavení laboratoře a nutnosti dodržování bezpečnostních podmínek při práci s radioaktivními látkami. Dále je možné použít pro nepřímý průkaz mykoplasmat i specifické komplement fixační reakce a MIT (Bednář et al., 1996; Cimolai, 2001; Lukáš, 2000).

5 Terapie a prevence

5.1 Citlivost na antibiotika

Testování účinnosti antimikrobiálních látek na mykoplasmata se běžně neprovádí (Greene, 2012). Obecně jsou mykoplasmata díky absenci peptidoglykanu v membráně, rezistentní k beta-laktamovým antibiotikům i k sulfonamidům. Citlivá jsou hlavně k antibiotikům jako tetracykliny (například doxycyklin) či makrolidy (tylosin, erytromycin, azitromycin, klaritromycin), které inhibují proteosyntézu. Dále jsou mykoplasmata citlivá k chloramfenikolu, spiramycinu, linkomycinu, klindamycinu, nitrofuránům, tiamulinu, chinolonům a aminoglykosidům. V poslední době jsou chinolony nahrazovány jejich deriváty tzv. flourochinolony označovány podle připojeného atomu fluoru k základní molekule (Bednář et al., 1996, Greene, 2012; Greenwood et al., 1999; Nýč et al., 2006; Svoboda et al., 1996).

Tetracykliny jsou širokospektrá antibiotika, která působí i na řadu dalších mikroorganismů. Působí bakteriostaticky a inhibují syntézu proteinů tím, že se váží na 30S podjednotku ribozomu a brání tak připevnění komplexu aminoacyl - tRNA na ribozomální akceptor (Chopra a Roberts, 2001; Waites et al., 2005). Makrolidy působí bakteriostaticky. Pronikají do bakteriální buňky, váží se na 50S podjednotku ribozomu a inhibují proteosyntézu. Buňka není schopná syntetizovat bílkoviny a hyne (Havlík, 2010).

Fluorochinolony patří do skupiny baktericidních antibiotik s širokým antimikrobiálním spektrem. Mechanismus jejich působení je inhibice DNA prostřednictvím inaktivace enzymů topoizomeráz (DNA gyrázy a topoizomerázy IV). Rezistence na tyto antibiotika je nejčastěji způsobena mutací genů řídících replikaci a segregaci chromozomální DNA. Fluorochinolony jsou rezervní léky, indikované pouze v situacích, kde jsou jiná antibiotika *in vitro* neúčinná (Nýč et al., 2006).

Léčba se musí provádět vždy po delší dobu. Tetracykliny, chinolony a chloramfenikoly by neměly být podávány březím fenám a nejsou vhodná pro mláďata. Naopak linkomycin a makrolidy, zejména erytromycin jsou sice méně účinné, ale díky tomu bezpečnější a mohou se podávat i v průběhu gravidity. Azitromycin ve srovnání s erytromycinem, způsobuje mnohem méně gastrointestinálních vedlejších účinků (Greene, 2012; Svoboda et al., 1996).

5.2 Prevence

K dispozici nejsou žádné vakcíny proti mykoplasmovým infekcím u psů, i když vakcinace se velmi úspěšně provádí u jiných zvířat (Greene, 2012). Pokud jsou infikovaní psi chováni společně s dalšími zvířaty je nejlepší prevencí izolace jedince a zavedení účinné terapie. Vhodné je zlepšit výživu, podmínky chovu a podpořit imunitní systém psa podáváním vitamínů a minerálů (Svoboda et al., 1996).

6 Závěr

V bakalářské práci byla věnována pozornost patogenním mykoplasmatům vyskytujících se u psů. Jedná se o nejmenší prokaryotické buňky schopné samostatné replikace. Vyznačují se malou velikostí genomu a třívrstevnou membránou na povrchu buňky, která je odpovědná za pleomorfismus bakterií.

M. cynos se podílí na rozvoji infekcí dýchacích cest u psů. *M. canis* je patogen, který napadá sliznici urogenitálního traktu. *M. haemocanis* a '*Candidatus M. haematoparvum*' jsou krevní patogeny způsobující anémie. V jedné studii bylo *M. edwardii* označené jako původce meningitidy psa.

Mykoplasmata jsou diagnostikována přímými i nepřímými metodami. Mezi přímé metody patří kultivační vyšetření na PLO mediích. Více využívané jsou molekulárně biologické metody jako PCR, které jsou oproti kultivaci přesnější a časově méně náročné. Nepřímá diagnostika zahrnuje sérologické metody založené na průkazu specifických protilátek.

V léčbě mykoplasmových infekcí jsou nejvíce používány tetracyklinové, makrolidové a fluorochinolové antibiotika. Tetracykliny a fluorochinolony by se vzhledem k jejich toxicitě neměly podávat gravidním fenám. Absence peptidoglykanu ve vnější membráně zapříčiňuje, že jsou mykoplasmata rezistentní k beta-laktamovým antibiotikům a sulfonamidům.

7 Seznam použité literatury

- AQUINO, L. C. et al., 2016. Analysis of risk factors and prevalence of haemoplasma infection in dogs. *Veterinary parasitology*, **221**, 111-117. ISSN 0304-4017.
- BACTERIO.NET: rod *Mycoplasma*, [online]. Bacterio.net. [cit. 5.3.2017]. dostupné z: <http://www.bacterio.net/mycoplasma.html>
- BACZYNSKA, A. et al., 2004. Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. *BMC microbiology*, **4**(1), 35. DOI: 10.1186/1471-2180-4-35.
- BARBER, R. M. et al., 2012. Broadly reactive polymerase chain reaction for pathogen detection in canine granulomatous meningoencephalomyelitis and necrotizing meningoencephalitis. *Journal of veterinary internal medicine*, **26**(4), 962-968. ISSN 0891-6640.
- BARKER, E. N. et al., 2010. Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” in dogs. *Veterinary microbiology*, **140**(1), s. 167-170. ISSN 0378-1135.
- BEDNÁŘ, M. et al., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Triton, 558 s. ISBN 80-238-0297-6.
- BERČIČ, R. L. et al., 2012. Demonstration of neuraminidase activity in *Mycoplasma neurolyticum* and of neuraminidase proteins in three canine *Mycoplasma* species. *Veterinary microbiology*, **155**(2), 425-429. ISSN 0378-1135.
- BIONDO, A. W. et al., 2009. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinária*, **18**(3), 1-7. ISSN 1984-2961.
- BROWN, D. R. et al., 2012. Genome annotation of five *Mycoplasma canis* Strains. *Journal of bacteriology*, **194**(15), 4138-4139. DOI: 10.1128/JB.00664-12.
- BROWNING, G. F. a CH. CITTI, 2014. *Mollicutes: Molecular Biology and Pathogenesis*. 1. vyd. Norfolk: Caister Academic Press, 350 s. ISBN 978-1-908230-30-0.

CANNON, S. H. et al., 2016. Infectious diseases in dogs rescued during dogfighting investigations. *The Veterinary Journal*, **211**, 64-69. ISSN. 1090-0233.

CIMOLAI, N., 2001. *Laboratory diagnosis of bacterial infections*. New York: Marcel Dekker, 936 s. ISBN 0-8247-0589-0.

CLYDE, W. A., 1964. Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antisera. *The Journal of Immunology*, **92**(6), 958 - 965. ISSN 0022-1767.

COMPTON, S. M., R. G. MAGGI, a E. B. BREITSCHWERDT, 2012. Candidatus *Mycoplasma haematoparvum* and *Mycoplasma haemocanis* infections in dogs from the United States. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, **35**(6), 557-562. ISSN 0147-9571.

DECARO, N. et al., 2016. Molecular surveillance of traditional and emerging pathogens associated with canine infectious respiratory disease. *Veterinary Microbiology*, **192**, 21-25. ISSN 0378-1135.

DEMINA, I. A. et al., 2011. Comparative proteomic characteristic of mycoplasmas (Mollicutes). *Russian journal of bioorganic chemistry*, **37**(1), 61-70. ISSN 1068-1620.

DO NASCIMENTO, N. C. et al., 2012. *Mycoplasma haemocanis* – the canine hemoplasma and its feline counterpart in the genomic era. *Veterinary research*, **43**(1), 66. DOI: 10.1186/1297-9716-43-66.

DOIG, P. A., H. L. RUHNKE a W. T. BOSU, 1981. The genital Mycoplasma and Ureaplasma flora of healthy and diseased dogs. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, **45**(3), 233-238.

FRAGA, D., T. MEULIA, a S. FENSTER, 2008. Real-time PCR. *Current protocols essential laboratory techniques*, **10**(3), 10.3.1-10.3.34.

GREENE, C. E., 2012. *Infectious diseases of the dog and cat*. 4. vyd., ed. St. Louis, Mo.: Elsevier/Saunders. ISBN 978-1-4160-6130-4.

GREENWOOD, D. et al., 1999. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Přel. J. Schindler. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 690 s. ISBN 80-716-9365-0.

- HAVLÍK, J., 2010. Makrolidová antibiotika a jejich využití v ambulantní praxi. *Medicína pro praxi*, **7**(10), 365 - 367.
- HONG, S. a O. KIM, 2012. Molecular identification of *Mycoplasma cynos* from laboratory beagle dogs with respiratory disease. *Laboratory Animal Research*, **28**(1), 61- 66. ISSN 1738-6055.
- CHALKER, V. J., 2005. Canine mycoplasmas. *Research in veterinary science*, **79**(1), 1- 8. ISSN 0034-5288.
- CHALKER, V. J. a J. BROWNLIE, 2004. Taxonomy of the canine Mollicutes by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **54**(2), 537-542. ISSN 1466-5026.
- CHALKER, V. J. et al., 2004. Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease. *Microbiology*, **150**(10), 3491-3497. ISSN 1350-0872.
- CHOPRA, I. a M. ROBERTS, 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, **65**(2), 232-260. ISSN 1092-2172.
- CHVALA, S. et al., 2007. Simultaneous canine distemper virus, canine adenovirus type 2, and *Mycoplasma cynos* infection in a dog with pneumonia. *Veterinary pathology*, **44**(4), 508-512. ISSN 0300-9858.
- ILHA, M. R. S. et al., 2010. Meningoencephalitis caused by *Mycoplasma edwardii* in a dog. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, **22**(5), 805-808. ISSN 1040-6387.
- INOKUMA, H. et al., 2006. Epidemiological survey of *Ehrlichia canis* and related species infection in dogs in eastern Sudan. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1078**(1), 461-463. ISSN 0077-8923.
- KAEWMONGKOL, G. et al., 2017. Association of *Ehrlichia canis*, Hemotropic *Mycoplasma* spp. and *Anaplasma platys* and severe anemia in dogs in Thailand. *Veterinary Microbiology*, **201**, 195-200. ISSN 0378-1135.
- KASTELIC, S. et al., 2015. Molecular characterisation of the *Mycoplasma cynos* haemagglutinin HapA. *Veterinary microbiology*, **175**(1), 35-43. ISSN 0378-1135.

KLABAN, V., 2005. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Praha: Galén, 654 s. ISBN 80-7262-341-9.

LUKÁŠ, F. Mykoplazmové infekce psů. Pardubice, 2000. 32 s. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce doc. MVDr. Jaroslava Mazurová, Csc.

MAGGI, R. G. et al., 2014. Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs. *Parasites & vectors*, **7**(1), 127. DOI: 10.1186/1756-3305-7-127.

MANNERING, S. A. et al., 2009. Strain typing of *Mycoplasma cynos* isolates from dogs with respiratory disease. *Veterinary Microbiology*, **135**, 292–296. ISSN 0378-1135.

MASCARELLI, P. E. et al., 2016. Detection of *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma haematoparvum*, *Mycoplasma suis* and other vector-borne pathogens in dogs from Córdoba and Santa Fé, Argentina. *Parasites & Vectors*, **9**(1), 642. DOI: 10.1186/s13071-016-1920-8

MAY, M. a D. R. BROWN, 2009. Secreted sialidase activity of canine mycoplasmas. *Veterinary microbiology*, **137**(3), 380-383. ISSN 0378-1135.

MESSICK, J. B., 2004. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Veterinary Clinical Pathology*, **33**(1), 2-13. ISSN 0275-6382.

MICHAELS, D. L. et al., 2016. Cellular microbiology of *Mycoplasma canis*. *Infection and immunity*, **84**(6), 1785-1795. ISSN 0019-9567.

NISHIDA, Y. et al., 2012. An easy α -glycosylation methodology for the synthesis and stereochemistry of mycoplasma α -glycolipid antigens. *Beilstein journal of organic chemistry* [online], **8**(1), 629-639. [cit.2017-03-10]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3343289/>.

NOVACCO, M. et al., 2010. Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. *Veterinary microbiology*, **142**(3), 276-284. ISSN 0378-1135.

- NÝČ, O. et al., 2006. Konsenzus používání antibiotik III. Chinolony. *Prakt Léč*, **86**(10), 570 - 574.
- PARKER, M. T. a B. J. DUERDEN, 1993. *Systematic bacteriology*. Philadelphia: B. C. Decker, 709 s. ISBN 1-55664-290-3. Kapitola 2.33, The Mycoplasmatales, 664 - 681.
- PRIESTNALL, S. L. et al., 2014. New and emerging pathogens in canine infectious respiratory disease. *Veterinary pathology*, **51**(2), 492 - 504. ISSN 0300-9858.
- QUINN, P. J. et al., 1994. *Clinical veterinary microbiology*. London: Wolfe Publishing, 648 s. ISBN 0-7234-1711-3. Kapitola 35, The Mycoplasmas (Class: Mollicutes).
- RAZIN, S. et al., 1963. Chemical Composition of Mycoplasma Cells and Membranes. *Microbiology*, **33**(3), 477- 487. ISSN 022-1287.
- RAZIN, S. a E. JACOBS, 1992. Mycoplasma adhesion. *Journal of General Microbiology*, **138**, 407 - 422. ISSN 0022-1287.
- RAZIN, S., 1978. The Mycoplasmas. *Microbiological reviews*, **42**(2), ISSN 0146-0749.
- RAZIN, S., D. YOGEV a Y. NAOT, 1998. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online], **62**(4), 1094-1156. Dostupné z: <http://mmbr.asm.org/content/62/4/1094.long#sec-89>. ISSN 1092-2172 [cit. 2017-02-27].
- RIVERA, A. a L. CEDILLO, 2015. Mycoplasmas and nucleases. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, **9**(3), 2115-2126. ISSN 0973-7510.
- ROSENDAL, S., 1973. *Mycoplasma cynos*, a new canine *Mycoplasma* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **23**(1), 49-54. ISSN 0020-7713.
- ROTTEM, S., 2003. Interaction of Mycoplasmas With Host Cells. *Physiological reviews*, **83**(2), 417-432. ISSN 1522-1210.
- ROURA, X. et al., 2010. Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **22**(2), 270-274. ISSN 1040-6387.

- RYCROFT, A. N., E. TSOUNAKOU a V. CHALKER, 2007. Serological evidence of *Mycoplasma cynos* infection in canine infectious respiratory disease. *Veterinary Microbiology*, **120**, 358–362. ISSN 0378-1135.
- SEDLÁČEK, I., 2007. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- SCHLEGEL, H. G., 1993. *General microbiology*. 7. vyd. New York, NY, USA: Cambridge University Press, 655 s. ISBN 0-521-43980-9. Kapitola 3.19, The mycoplasma group, 132 - 134.
- SPERGSEER, J. a R. ROSENGARTEN, 2007. Identification and differentiation of canine *Mycoplasma* isolates by 16S–23S rDNA PCR-RFLP. *Veterinary microbiology*, **125**(1), 170-174. ISSN 0378-1135.
- SMITH, J., 2008. Canine prostatic disease: a review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. *Theriogenology*, **70**(3), 375-383. ISSN 0093-691X.
- SOTO, F. et al., 2017. Occurrence of canine hemotropic mycoplasmas in domestic dogs from urban and rural areas of the Valdivia Province, southern Chile. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **50**, 70-77. ISSN 0147-9571.
- STÜLKE, J., H. EILERS a R. S. SCHMIDL (edited)., 2009. Mycoplasma and Spiroplasma. *The desk Encyclopedia of Microbiology (Second Edition)*. Amsterdam: Academic, 1259 s. ISBN 978-0-12-374980-2.
- SVOBODA, M. et al., 1996. *Infekční nemoci psa a kočky*. 1. vyd. Brno: Česká asociace veterinárních lékařů malých zvířat, 504 s.
- SYKES, J. E. et al., 2005. ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’, a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **55**(1), 27-30. ISSN 1466-5026.
- TULLY, J. G. a S. RAZIN (edited), 1983. *Methods in Mycoplasmaology II: Diagnostic mycoplasmaology*. Academic Press. ISBN 0-12-583802-6.
- TULLY, J. G. a R. F. WHITCOMB (edited), 1979. *The mycoplasmas II: Human and Animal Mycoplasmas*. Academic Press. ISBN 01-207-8402-5.

- VARANAT, M. et al., 2011. Molecular prevalence of *Bartonella*, *Babesia*, and hemotropic *Mycoplasma* sp. in dogs with splenic disease. *Journal of veterinary internal medicine*, **25**(6), 1284-1291.
- VAŘEJKA, F., O. MRÁZ. a J. SMOLA, 1989. *Speciální veterinární mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 264 s. ISBN 80-209-0042-X.
- VOTAVA, M. et al., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Brno: NEPTUN, 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
- VOTAVA, M. et al., 2010. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: NEPTUN, 495 s. ISBN 978-80-86850-04-8.
- WAITES, K. B., B. KATZ a R. L. SCHELONKA, 2005. Mycoplasmas and Ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clinical microbiology reviews*, **18**(4), 757-789. ISSN 0893-8512.
- WALKER, C. A. et al., 2013. Complete genome sequence of *Mycoplasma cynos* Strain C142. *Genome Announc*, **1**(1). DOI: 10.1128/genomeA.00196-12.
- WALKER, S. T., 1998. *Microbiology*. 1. vyd. Philadelphia: W.B. Saunders Co, 504 s. ISBN 0-7216-4641-7.
- WARDROP, K. J. et al., 2005. Canine and feline blood donor screening for infectious disease. *J Vet Intern Med*, **19**(1), 135-142. ISSN 0891-6640.
- WARMAN, S. M. et al., 2010. Haemoplasma infection is not a common cause of canine immune-mediated haemolytic anaemia in the UK. *Journal of Small Animal Practice*, **51**(10), 534-539. ISSN 0022-4510.
- WENGI, N. et al., 2008. Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. *Veterinary microbiology*, **126**(1), 132-141.
- WILLI, B. et al., 2010. Haemotropic mycoplasmas of cats and dogs: transmission, diagnosis, prevalence and importance in Europe. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, **152**(5), 237-244. ISSN 0036-7281.

ZAMBOR, M., J. JAVOROVÁ, a E. VIKOVÁ, 1990. Diagnostika, klinika a liečba uretritíd vyvolaných mykoplazmami. *Československá dermatologie*, **65**(3), 220-225. ISSN 0009-0514.

8 Zdroje obrázků a tabulek

BEDNÁŘ, M. et al., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Triton, 558 s. ISBN 80-238-0297-6.

DO NASCIMENTO, N. C. et al., 2012. *Mycoplasma haemocanis* – the canine hemoplasma and its feline counterpart in the genomic era. *Veterinary research*, **43**(1), 66. DOI: 10.1186/1297-9716-43-66.

CHALKER, V. J., 2005. Canine mycoplasmas. *Research in veterinary science*, **79**(1), 1-8. ISSN 0034-5288.

ILHA, M. R. S. et al., 2010. Meningoencephalitis caused by *Mycoplasma edwardii* in a dog. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, **22**(5), 805-808. ISSN 1040-6387.

MAY, M. a D. R. BROWN, 2009. Secreted sialidase activity of canine mycoplasmas. *Veterinary microbiology*, **137**(3), 380-383. ISSN 0378-1135.

MESSICK, J. B., 2004. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Veterinary Clinical Pathology*, **33**(1), 2-13. ISSN 0275-6382.

QUINN, P. J. et al., 1994. *Clinical veterinary microbiology*. London: Wolfe Publishing, 648 s. ISBN 0-7234-1711-3. Kapitola 35, The Mycoplasmas (Class: Mollicutes).

ROSENDAL, S., 1973. *Mycoplasma cynos*, a new canine *Mycoplasma* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **23**(1), 49-54. ISSN 0020-7713.

ROTTEM, S., 2003. Interaction of Mycoplasmas With Host Cells. *Physiological reviews*, **83**(2), 417-432. ISSN 1522-1210.

SEDLÁČEK, I., 2007. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.