

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2025

Šárka Procházková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Patogeny dýchacích cest a jejich detekce
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Šárka Procházková**
Osobní číslo: **C22231**
Studijní program: **B0914P360019 Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Patogeny dýchacích cest a jejich detekce**
Téma práce anglicky: **Respiratory Pathogens and Their Detection**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Popis problematiky a vybraných patogenů
2. Detekční metody současné, možnosti do budoucna

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2025**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem *Patogeny dýchacích cest a jejich detekce* 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20. 06. 2025

Šárka Procházková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, Ph.D. za skvělý přístup, cenné rady a pomoc. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a svým přátelům, kteří mě plně podporovali po celou dobu studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou patogenů dýchacích cest a metodami jejich detekce. V úvodních kapitolách jsou podrobně popsány vybrané bakteriální patogeny, mezi něž patří *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* a *Legionella pneumophila*. U každého z nich je věnována pozornost patogenezí, faktorům virulence, klinickým projevům i epidemiologii. Následující část práce se zaměřuje na diagnostické a detekční metody využívané při identifikaci těchto mikroorganismů, zejména na metody molekulární biologie, jako jsou PCR, real-time PCR, hybridizační techniky a sekvenace. V závěru jsou diskutovány aktuální trendy a budoucí směry v oblasti diagnostiky, včetně využití nových technologií a umělé inteligence.

KLÍČOVÁ SLOVA

patogeny dýchacích cest, molekulární diagnostika, PCR, detekce, bakteriální infekce

TITLE

Respiratory Pathogens and Their Detection

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with respiratory pathogens and the methods of their detection. The initial chapters provide a detailed description of selected bacterial pathogens, including *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, and *Legionella pneumophila*. For each pathogen, the work focuses on pathogenesis, virulence factors, clinical manifestations, and epidemiology. The following part concentrates on diagnostic and detection techniques used in identifying these microorganisms, particularly molecular biology methods such as PCR, real-time PCR, hybridization techniques, and sequencing. The thesis concludes with a discussion of current trends and future directions in diagnostics, including the use of new technologies and artificial intelligence.

KEYWORDS

respiratory tract pathogens, molecular diagnostics, PCR, detection, bacterial infections

OBSAH

1 ÚVOD	13
2 PATOGENY DÝCHACÍCH CEST	14
2.1 Úvod do problematiky	14
2.2 Bordetella pertussis	15
2.2.1 Patogeneze a faktory virulence	16
2.2.2 Klinické projevy	17
2.2.3 Epidemiologie	18
2.3 Streptococcus pneumoniae	19
2.3.1 Patogeneze a faktory virulence	20
2.3.2 Klinické projevy	21
2.3.3 Epidemiologie	22
2.4 Haemophilus influenzae	23
2.4.1 Patogeneze a faktory virulence	24
2.4.2 Klinické projevy	25
2.4.3 Epidemiologie	26
2.5 Mycoplasma pneumoniae	27
2.5.1 Patogeneze a faktory virulence	27
2.5.2 Klinické projevy	28
2.5.3 Epidemiologie	29
2.6 Legionella pneumophila	30
2.6.1 Patogeneze a faktory virulence	31
2.6.2 Klinické projevy	32
2.6.3 Epidemiologie	32
3 DIAGNOSTICKÉ METODY A DETEKCE	34
3.1 Úvod do diagnostiky	34
3.2 Obecné principy molekulární diagnostiky	35
3.2.1 PCR	35
3.2.2 Real-time PCR (qPCR)	37
3.2.3 Hybridizační metody	39
3.2.4 Sekvence	40
3.3 Detekce jednotlivých patogenů	42
3.3.1 Bordetella pertussis	42

3.3.2 Streptococcus pneumoniae	43
3.3.3 Haemophilus influenzae	43
3.3.4 Mycoplasma pneumoniae	44
3.3.5 Legionella pneumophila	45
3.4 Trendy a budoucí směry diagnostiky	45
3.4.1 Nové technologie a přístupy	46
3.4.2 Molekulární inovace	46
3.4.3 Role umělé inteligence.....	47
4 ZÁVĚR	49
POUŽITÁ LITERATURA.....	50

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Kolonie <i>Bordetella pertussis</i>	15
Obrázek 2: Kolonie <i>Streptococcus pneumoniae</i>	19
Obrázek 3: Kolonie <i>Haemophilus influenzae</i>	24
Obrázek 4: Kolonie <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	27
Obrázek 5: Kolonie <i>Legionella pneumophila</i>	30
Obrázek 6: Základní princip polymerázové řetězové reakce (PCR)	36
Obrázek 7: Základní princip kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR)	38
Obrázek 8: Obecný postup FISH metody	40
Obrázek 9: Princip detekce pomocí CRISPR/Cas12 a fluorescenčního signálu	47

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACV – Acelulární vakcína (z angl. Acellular Vaccine)

ADP – Adenosindifosfát (z angl. Adenosine Diphosphate)

AI – Umělá inteligence (z angl. Artificial Intelligence)

ALT – Alaninaminotransferáza (z angl. Alanine Aminotransferase)

AST – Aspartátaminotransferáza (z angl. Aspartate Aminotransferase)

BALF – Tekutina z bronchoalveolární laváže (z angl. Bronchoalveolar Lavage Fluid)

BCYE – Půda s aktivním uhlím a kvasinkovým extraktem (z angl. Buffered Charcoal Yeast Extract)

BvgAS – Regulační systém virulence BvgAS (z angl. Bordetella virulence gene regulatory system)

CARDS – Toxin syndromu respirační tísně získané v komunitě (z angl. Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome)

CDC – Cholesterolu dependentní cytolyziny (z angl. Cholesterol-Dependent Cytolysins)

CHOPN – Chronická obstrukční plicní nemoc

CK – Kreatinkináza (z angl. Creatine Kinase)

CRISPR – Pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice (z angl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

CRP – C-reaktivní protein (z angl. C-Reactive Protein)

CT – Počítačová tomografie (z angl. Computed Tomography)

DIC – Diseminovaná intravaskulární koagulace (z angl. Disseminated Intravascular Coagulation)

DNA – Deoxyribonukleová kyselina (z angl. Deoxyribonucleic Acid)

dNTPs – Deoxyribonukleotidtrifosfáty (z angl. deoxynucleotide triphosphates)

FHA – Filamentózní hemagglutinin (z angl. Filamentous Hemagglutinin)

FISH – Fluorescenční in situ hybridizace (z angl. Fluorescence in situ hybridization)

HBA – Hemolytický krevní agar (z angl. Hemolysis on Blood Agar)

Hib – Haemophilus influenzae typu b

IDP – Potenciál invazivního onemocnění (z angl. Invasive Disease Potential)

IPD – Invazivní pneumokoková onemocnění (z angl. Invasive Pneumococcal Disease)

LAMP – Smyčkově izotermální amplifikace (z angl. Loop-Mediated Isothermal Amplification)

Mip – Faktor potenciace infekčnosti makrofágů (z angl. Macrophage infectivity potentiator)

NGS – Sekvenování nové generace (z angl. Next Generation Sequencing)

NThi – Netytovatelný Haemophilus influenzae (z angl. Non-typeable Haemophilus influenzae)

NVTs – Sérotypy nezahrnuté ve vakcíně (z angl. Non-Vaccine Types)

PCR – Polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)

PCV – Pneumokoková konjugovaná vakcína (z angl. Pneumococcal Conjugate Vaccine)

Plt – Pertusoidní toxin (z angl. Pertussis-like toxin)

PLY – Pneumolyzin (z angl. Pneumolysin)

POC – Místo péče (z angl. Point of Care)

POCT – Diagnostika na místě péče (z angl. Point-of-Care Testing)

PRN – Pertaktin (z angl. Pertactin)

qP – Vakcína s acelulární pertusovou složkou (z angl. acellular Pertussis)

qPCR – Kvantitativní PCR (z angl. quantitative PCR)

RNA – Ribonukleová kyselina (z angl. Ribonucleic Acid)

SBA – Standardní krevní agar (z angl. Standard Blood Agar)

SBS – Sekvenování syntézou (z angl. Sequencing by Synthesis)

T2SS – Sekreční systém typu II (z angl. Type II Secretion System)

TLR – Toll-like receptory (z angl. Toll-Like Receptors)

WCV – Celobuněčná vakcína (z angl. Whole-cell Vaccine)

WHO – Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organization)

wP – Vakcína s celobuněčnou pertusovou složkou (z angl. whole-cell Pertussis)

1 ÚVOD

Respirační infekce představují významný zdravotní problém, který ovlivňuje širokou populaci napříč věkovými kategoriemi. Správná identifikace původců onemocnění je zásadní pro účinnou léčbu, prevenci komplikací a zamezení šíření infekce. Patogeny dýchacích cest zahrnují řadu bakterií s odlišnými vlastnostmi, klinickými projevy a epidemiologickými charakteristikami.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na vybrané významné bakteriální patogeny dýchacích cest, jako jsou *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* a *Legionella pneumophila*. Jsou zde popsány jejich patogeneze, faktory virulence, klinické projevy a epidemiologické aspekty.

Druhá část práce je věnována diagnostickým metodám používaným pro detekci těchto patogenů, přičemž zvláštní pozornost je věnována molekulárním technikám, jako jsou PCR a real-time PCR, které představují současný standard laboratorní diagnostiky díky své citlivosti a rychlosti.

Práce tak poskytuje komplexní pohled na význam bakteriálních patogenů dýchacích cest a možnosti jejich detekce, což je klíčové pro zlepšení zdravotní péče a veřejného zdraví.

2 PATOGENY DÝCHACÍCH CEST

2.1 Úvod do problematiky

Dýchací cesty jsou vystaveny neustálému kontaktu s různými patogeny, které mohou způsobit celou řadu infekcí, od lehkých nachlazení až po závažné respirační onemocnění, jako je pneumonie nebo bronchitida. Mezi hlavní bakterie, které jsou původci infekcí dolních dýchacích cest, patří *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* a *Legionella pneumophila*. Tyto patogeny mají zásadní roli v etiologii komunitně získaných respiračních infekcí a jejich prevalence se může lišit podle geografické oblasti a ročního období. Kromě toho hraje významnou roli i výskyt rezistence vůči antibiotikům, což komplikuje diagnostiku a léčbu těchto infekcí (Debbia et al., 2001).

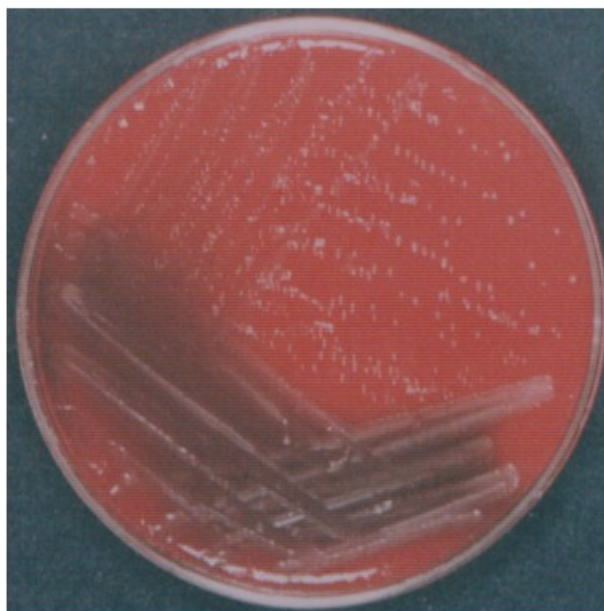
Rezistence na antibiotika se stává čím dál větším problémem v léčbě bakteriálních infekcí, včetně infekcí dýchacích cest. Rychlý nárůst rezistentních patogenů je způsoben především nadměrným užíváním antibiotik, které vede ke vzniku bakterií odolných vůči těmto lékům. Klíčové bakterie, jako *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae*, mohou vyvinout rezistenci vůči širokému spektru antibiotik, například penicilinu a ampicilinu. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) narůstá počet pacientů ohrožených infekcemi způsobenými prioritními patogeny – bakteriemi, proti nimž je potřeba vyvinout nová antibiotika. Mezi tyto MO patří i rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus* nebo *Klebsiella pneumoniae*.

Bez účinné kontroly a nových léčebných strategií se riziko výskytu těchto infekcí i jejich komplikací, včetně vyšší úmrtnosti, bude i nadále zvyšovat. V současnosti se stále více zdůrazňuje důležitost epidemiologických studií a správného monitorování výskytu antibiotické rezistence, které mohou přispět k včasné detekci změn ve vzorcích rezistence a pomoci při optimalizaci léčebných strategií (Mancuso et al., 2021).

Výzvou pro současnou medicínu je nejen léčba respiračních onemocnění, ale také efektivní prevence a kontrola šíření patogenů. K tomu je nezbytná koordinace mezi odborníky na ústní zdraví, mikrobiology a veřejnými zdravotními institucemi. Ústní mikroflóra má klíčový vliv na rozvoj respiračních infekcí, což činí prevenci poruch rovnováhy této mikroflóry zásadní součástí nejen léčby, ale i prevence onemocnění dýchacích cest. Pravidelná péče o ústní hygienu může výrazně přispět k omezení šíření bakterií a virů odpovědných za respirační onemocnění a tím podpořit celkovou prevenci infekcí a zlepšit zdraví populace (Gupta et al., 2024).

2.2 Bordetella pertussis

Bordetella pertussis je gramnegativní bakterie způsobující velice závažné onemocnění dýchacích cest, pro které je typický kašel připomínající dávení. Napadá jak horní tak dolní dýchací cesty, zejména pak průdušky a průdušnice. Onemocnění způsobené touto bakterií se v České republice pojmenovává jako „černý kašel,“ který byl v první polovině 20. století jedním z hlavních příčin úmrtnosti zejména dětí, dnes mu však můžeme předcházet očkováním. I přes snahu této nemoci zabránit očkováním, stále se setkáváme s cyklicky opakující se nákazou po 3 až 5 letech. Největší úmrtnost se vyskytuje u novorozenců a mladších 3 měsíců, protože jejich imunitní systém ještě není plně vyvinutý, což zvyšuje riziko závažného průběhu onemocnění. U této věkové skupiny jsou časté komplikace jako respirační selhání a apnoe, které mohou vést k fatálním následkům, zejména než je zahájeno očkování (Nieves a Heininger, 2016).



Obrázek 1: Kolonie *Bordetella pertussis*

Kolonie *Bordetella pertussis* na Bordet-Gengou (BG) médiu mají typický vzhled drobných, hladkých, vyvýšených kolonií s lehkým kovovým leskem, připomínající kapky rtuti. Často se kolem nich vytváří difuzní zóna hemolýzy. Tento selektivní agar obsahuje cefalexin, který potlačuje růst nežádoucí mikroflóry a umožňuje izolaci *B. pertussis*, hlavního původce černého kašle (Mughal et al., 2011).

2.2.1 Patogeneze a faktory virulence

Patogeneze *Bordetella pertussis* je složitý proces, při kterém bakterie využívá různé mechanismy k vyvolání infekce dýchacích cest. Tento proces je řízen regulačním systémem BvgAS, který umožňuje bakteriím reagovat na změny v prostředí a přepínat mezi různými fenotypickými stavy. Bakterie v infekční fázi aktivují BvgAS, což jim umožňuje přizpůsobit se podmínkám hostitele. Tento regulační systém je klíčový pro přežití bakterií v plicích a následné šíření infekce. Při infekci dýchacích cest dochází k oslabení imunitní odpovědi, což umožňuje bakteriím přežít a následně se množit. Bakterie se snadno přichytí na sliznici a vyvolají zánětlivý proces, který se projevuje charakteristickými příznaky, jako je kašel a potíže s dýcháním. Vysoká míra virulence a schopnost bakterií se přizpůsobit hostitelskému prostředí jsou hlavními faktory, které přispívají k rozvoji onemocnění (Melvin et al., 2014).

B. pertussis produkuje velké množství faktorů virulence, které následně hrají velkou roli při stanovení závažnosti nemoci. Mezi charakteristické toxiny patří: pertusový toxin, adenylátcyklázový toxin a filamentózní hemaglutinin (FHA), ty přispívají k poškození hostitelských buněk a imunitní odpovědi. K dalším důležitým faktorům patří kapsule a pertaktin (protein vnější membrány), které pomáhají bakteriím přežít v hostitelském organismu a usnadňují jejich adhezi k dýchacím cestám (Huh a Weiss, 1991).

Pertusový toxin je klíčový faktor virulence *B. pertussis*. Jedná se o A-B proteinový toxin, pro ten je typické, že se skládá z enzymatické složky A a vazebné složky B. Enzymaticky aktivní složkou je zde podjednotka S1, vazebná složka je pak tvořena oligomerem složeným s podjednotek S2, S3, S4 a S5. Aby mohl pertusový toxin vykonat svou funkci, musí projít několika kroky, včetně syntézy, sestavení, transportu a exkrece z bakterie. K transportu jednotlivých složek přes vnitřní membránu pak dochází pomocí sekrečního systému. U transportu přes vnější membránu používáme specializovaný transportní systém, známý jako Ptl systém. Ptl systém se skládá z devíti různých proteinů, (PtlA až PtlI), přičemž každý z těchto proteinů je nezbytný pro úspěšnou exkreci toxinu. V průběhu vylučování toxinu z bakterie je pertusový toxin transportován nejprve přes vnitřní membránu a poté přes vnější membránu, to je důležité pro udržení patogenity, protože umožňuje účinný přenos toxinu k eukaryotickým buňkám, kde může vyvolat intoxikaci (Burns, 2021).

Filamentózní hemaglutinin, známý jako FHA, je povrchový protein bakterie *Bordetella pertussis*, který hraje klíčovou roli při adhezi bakterie k lidským epiteliálním a fagocytujícím buňkám. Tento protein se v organismu syntetizuje jako prekurzor FhaB, který je následně transportován na povrch bakterie a zpracován proteázami na zralý FHA. Zralý FHA se pak

podílí na adhezi bakterie k hostitelským buňkám a na modifikaci imunitní odpovědi. Přestože se v minulosti předpokládalo, že FHA interaguje s integrinem CD11b/CD18 na makrofázích, nové studie ukázaly, že tomu tak není. Místo toho byla prokázána silná inhibice vazby FHA na buňky při přítomnosti heparinu, což naznačuje, že vazba FHA na buňky je řízena interakcí s heparin-vazebnou doménou a sulfátovanými glykosaminoglykany na buněčném povrchu (Golshani et al., 2022).

Pertaktin, autotransportní protein nacházející se ve vnější membráně *Bordetella pertussis*, se podílí na adhezi na hostitelské buňky a modulaci imunitní odpovědi. Je obsažen v acelulárních vakcínách proti černému kašli (aP vakcínách), které byly vyvinuty k náhradě původních vakcín na bázi celobuněčných vakcín (wP). Deficience pertaktinu (PRN-) u *B. pertussis* byla spojena s genetickými změnami, jako jsou vložení, delece, inverze a bodové mutace v genech, které kódují tento protein. Tyto PRN- kmeny vykazují vyšší schopnost kolonizovat dýchací cesty než kmeny PRN+, což naznačuje, že mohou mít selektivní výhodu ve vakcinovaných populacích. Význam pertaktinu pro klinické projevy černého kašle je stále předmětem výzkumu. Některé studie naznačují, že i když PRN- kmeny mohou mít nižší virulenci, jejich schopnost šířit infekci ve vakcinovaných populacích může vést k nárůstu výskytu onemocnění (Heininger et al., 2024).

2.2.2 Klinické projevy

Doba inkubace u nakaženého jedince se pohybuje mezi 5-7 dny, ve výjimečných případech může inkubace trvat až 20 dnů. Během této doby dochází k množení bakterie v epitelu dýchacích, zejména v řasinkovém epitelu, ten totiž produkuje hlavní faktory virulence (Kerr a Matthews, 2000).

Pro černý kašel jsou charakteristické tři hlavní fáze – stádium katarální, stádium paroxysmální a stádium rekonvalescence. První fáze, známá jako katarální stádium, je obdobím inkubace, kdy bakterie kolonizují horní cesty dýchací a začínají se množit. Tato fáze trvá přibližně dva týdny a zahrnuje příznaky podobné běžnému nachlazení, jako je mírná horečka, únava, bolest v krku, ucpaný nos, rýma, slzení očí, kýchání a suchý kašel. Během tohoto stádia je infekce velmi nakažlivá, i když příznaky nejsou závažné. Dále následuje paroxysmální fáze, kdy kašel zesiluje a může trvat několik týdnů. Nakonec přichází rekonvalescenční fáze, v níž příznaky postupně mizí. Výzkumy ukazují, že i při mírných infekcích v katarální fázi může dojít k šíření patogenu, což je problém, který současné vakcíny neřeší. Modely infekce u zvířat, zaměřené na paroxysmální fázi, nezohledňují katarální stádium, a proto byla vyvinuta nová experimentální metoda, která simuluje infekci

horních cest dýchacích u myší. Tento model umožňuje detailněji studovat počáteční fáze infekce a hledat nové způsoby prevence kolonizace a přenosu *Bordetella pertussis* (Soumana et al., 2022).

2.2.3 Epidemiologie

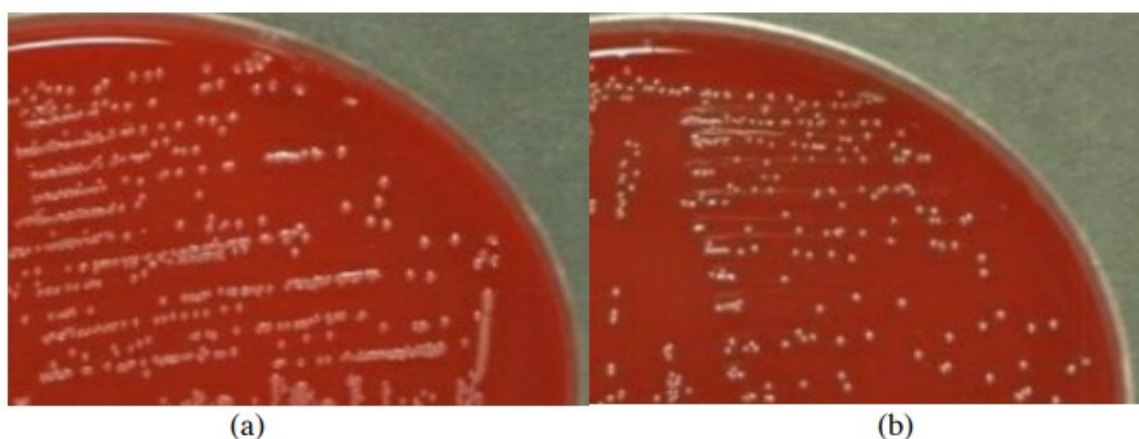
Epidemiologie *Bordetella pertussis* je dynamická a podléhá změnám. Klasicky byl černý kašel považován za onemocnění dětského věku, zejména u kojenců a malých dětí. Ukázalo se však, že může postihovat i dospělé s chronickým kašlem. Patogen se tedy v populaci vyskytuje endemicky. V zemích, kde došlo k vzestupu výskytu pertuse, lze pozorovat posuny v epidemiologii. I přes plošné očkování přetrvávala cyklická periodičita 3–5 let, což naznačuje, že vakcinace snižuje závažnost, ale nezabraňuje plně přenosu (Sealey et al., 2016a).

Například v Číně došlo k prudkému nárůstu případů z 10 390 v roce 2017 na více než 38 000 v letech 2022 a 2023, přičemž jen na začátku roku 2024 bylo hlášeno přes 32 000 případů. V USA dosáhl počet případů 5611 v roce 2023, což potvrzuje pokračující cirkulaci patogenu navzdory vysoké proočkovanosti. V Austrálii bylo v roce 2024 hlášeno 2910 případů, což rovněž svědčí o přetrvávajícím endemickém výskytu pertuse. Tento vývoj ukazuje, že k šíření přispívá nejen klesající imunita po očkování, ale i změny v prevenci a vývoji patogenu (Wan et al., 2024).

Dalším faktorem ovlivňujícím epidemiologii *B. pertussis* je asymptomatická infekce, která byla potvrzena jak sérologickými studiemi, tak i modelovými experimenty. Přítomnost bakterie byla prokázána nejen u pacientů s chronickým kašlem, ale i u jedinců bez zjevných klinických projevů. Modelové studie na paviánech ukázaly, že asymptomatická kolonizace probíhá snadno, přičemž očkování jedinci (zejména ACV vakcínou) vykazovali delší dobu nosičství než ti, kteří byli očkováni celobuněčnou vakcínou (WCV). Epidemiologické modely dále ukázaly, že přechod z WCV na ACV vedl ke zvýšení asymptomatické transmisibility a k následnému nárůstu incidence černého kašle v silně proočkovaných populacích. Data ze séroprevalenčních studií po celém světě dále ukazují, že počet osob se séropozitivitou výrazně převyšuje počet hlášených případů pertuse, a to ve všech věkových skupinách. To naznačuje, že asymptomatická infekce se vyskytuje v mnohem vyšší míře, než se dříve předpokládalo, což může být klíčovým faktorem pro perzistenci patogenu v populaci navzdory vysoké proočkovanosti (Sealey et al., 2016b).

2.3 Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pneumoniae je grampozitivní bakterie, která je nejčastější příčinou pneumonie (zápalu plic), a to zejména u malých dětí a starších dospělých. Napadá dolní dýchací cesty, kde způsobuje těžké zápal plic, dále pak záněty středního ucha, sinusitidy a meningitidy. Přestože očkování významně snižuje výskyt invazivních forem onemocnění, bakterie si vyvinula rezistenci vůči některým antibiotikům, což komplikuje její léčbu. Riziko pneumokokové infekce je nejvyšší u malých dětí do dvou let a seniorů nad 65 let, stejně jako u jedinců s chronickým onemocněním srdce, a u pacientů po odstranění sleziny. V diagnostice se uplatňuje především kultivace krve a sputa, případně nově vyvinutý test na pneumokokový antigen v moči, který umožňuje rychlou detekci infekce u dospělých pacientů (Örtqvist et al., 2005).



Obrázek 2: Kolonie *Streptococcus pneumoniae*

Kolonie *Streptococcus pneumoniae* na krevním agaru jsou drobné, okrouhlé a lesklé, s průměrem kolem 1 mm. Obrázek (a) ukazuje kolonie kultivované na standardním krevním agaru (SBA), zatímco obrázek (b) ukazuje kolonie rostoucí na krevním agaru s promytými erytrocyty (HBA). Po 24 hodinách inkubace jsou kolonie mírně větší na promytem krevním agaru, než na standardním, ale po 48 hodinách dosahují největšího průměru na standardním agaru. Kolonie produkují zóny alfa hemolýzy, což je typické pro tuto bakterii. Růst *Streptococcus pneumoniae* je aerobně tolerantní a vyžaduje médium obohacené o krev (Oktari et al., 2019).

2.3.1 Patogeneze a faktory virulence

Patogeneze *Streptococcus pneumoniae* je komplexní proces, při kterém bakterie využívá různé mechanismy k vyvolání infekce dýchacích cest. Pneumokoky běžně napadají horní cesty dýchací, přičemž k přichycení na epitel využívají specifické receptory, jako jsou disacharidové struktury na fibronektinu (glykoprotein extracelulární matrix podílející se na adhezi a migraci buněk). Tento proces může být usnadněn virovými infekcemi, jako je chřipka, kdy virové enzymy mění povrch epitelu a zvyšují přilnavost bakterií.

Při oslabení obranných mechanismů hostitele, jako je mukociliární clearance, sekreční IgA nebo kašlací reflex, může dojít k šíření pneumokoků do dolních dýchacích cest a následně do plicní tkáně. Při překonání slizniční bariéry se pneumokoky mohou dostat do krevního oběhu, což umožňuje šíření do dalších orgánů, například do mozkových plen, kde způsobují meningitidu. Rozvoj infekce je spojen s aktivací imunitní odpovědi, která vede k zánětlivé reakci v postižených tkáních. V pozdních stádiích infekce může intenzivní baktericidní účinek antibiotik, zejména β -laktamů, zvýšit uvolňování zánětlivých mediátorů, což se může projevit závažnějšími klinickými příznaky, jako jsou septický šok nebo diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC) (Alonsodevelasco et al., 1995).

Streptococcus pneumoniae produkuje různé virulence faktory, které významně přispívají k jeho patogenitě. Jako jeden z hlavních faktorů virulence je považován toxický protein pneumolysin (PLY). Tento protein patří do rodiny CDC, neboli cholesterol- dependentních cytolysinů a je uvolňován bakteriemi během infekce. PLY se váže na cholesterol v cytoplazmatické membráně hostitelských buněk, čímž umožňuje proniknutí do membrány. Tento proces způsobuje poškození tkání a podporuje šíření bakterií v hostiteli. PLY také zvyšuje schopnost bakterií přežít mimo hostitele, což dále přispívá k šíření infekce. Vzhledem k těmto vlastnostem se pneumolysin považuje za důležitý cíl pro vývoj nových terapeutických strategií, které by mohly zlepšit léčbu infekcí způsobených *Streptococcus pneumoniae* (Ding et al., 2022).

Povrchové proteiny *S. pneumoniae* hrají důležitou roli při infekci tím, že pomáhají bakterii přichytit se k buňkám hostitele a chránit ji před imunitní odpovědí. Mezi těmito proteiny jsou například autolysiny, neuraminidázy a cholin vázající proteiny, které jsou ukotvené na buněčné stěně bakterie. Některé z těchto proteinů jsou připojeny přímo k buněčné stěně, jiné interagují s komponentami buněk hostitele, což usnadňuje přilnutí bakterie a brání jejímu zničení imunitním systémem.

Hostitelské buňky rozpoznávají *S. pneumoniae* pomocí tzv. toll-like receptorů (TLR), což jsou receptory, které detekují patogeny a spouštějí imunitní odpověď. Aktivace TLR2, jednoho z těchto receptorů, vede k zánětlivým reakcím a produkci cytokinů, které mohou pomoci tělu bojovat s infekcí. Některé kmeny *S. pneumoniae* však mohou tuto odpověď zesílit, což naznačuje, že jsou více imunitně stimulující než jiné. Tato interakce mezi bakteriemi a hostitelem nám pomáhá lépe pochopit, jak infekce probíhá, a může přispět k vývoji nových léčebných metod (Anuar et al., 2024).

Autolysiny jsou enzymy, které hrají klíčovou roli v degradaci a přestavbě peptidoglykanu v buněčné stěně bakterií, jako je *Streptococcus pneumoniae*. Kódovány genem *lytA*, umožňují udržení tvaru buňky, její růst a dělení tím, že štěpí vazby v peptidoglykanu. Kromě toho mohou uvolňovat fragmenty buněčné stěny, které ovlivňují imunitní odpověď hostitele a mohou sloužit jako signální molekuly. Autolysin se podílí na virulenci, kolonizaci a invazi tkání, přičemž jeho aktivita může ovlivnit citlivost na antibiotika. Nadměrná aktivita autolysinu může vést k nadměrné degradaci buněčné stěny, což způsobí její oslabení a nakonec lýzu buňky (Lee a Lee, 2024).

Neuraminidázy jsou glykosidázové enzymy, které štěpí terminální zbytky kyseliny sialové z hostitelských glykokonjugátů. Tímto mechanismem dochází ke změnám ve fyzikálních vlastnostech a distribuci hlenu v horních dýchacích cestách, což umožňuje těsnější interakci bakterií s epitelem. Neuraminidázová aktivita podporuje kolonizaci *S. pneumoniae* tím, že usnadňuje bakteriím uchycení v pevné vrstvě hlenu přiléhající k epitelu, na rozdíl od volného hlenu, který se snáze odstraňuje mukociliárním transportem (mechanismus, při němž řasinky epitelu pohybují hlenem a odstraňují mikroby a nečistoty z dýchacích cest). Tato enzymatická činnost nejen zvyšuje hustotu bakteriální kolonizace, ale také přispívá k dlouhodobému osídlení dýchacích cest a zlepšuje schopnost bakterií unikat hostitelským obranným mechanismům (Montgomery et al., 2024).

2.3.2 Klinické projevy

Klinické projevy pneumonie způsobené *Streptococcus pneumoniae* se mohou výrazně lišit v závislosti na závažnosti onemocnění a individuálních faktorech pacientů. Nejčastějšími příznaky jsou kašel, horečka, produktivní sputum, dušnost, bolest na hrudi a abnormální dechové zvuky. Tyto příznaky mohou být doprovázeny výraznou změnou v laboratorních parametrech, jako je zvýšení počtu bílých krvinek a C-reaktivního proteinu (CRP). U některých pacientů může být přítomná i respirační insuficience, což se projevuje sníženou saturací kyslíku v krvi. Klinická závažnost může být hodnocena pomocí skórovacího systému

A-DROP, který zohledňuje věk, dehydrataci, respirační selhání, poruchy orientace a nízký krevní tlak. Pacienti s pneumonií způsobenou *S. pneumoniae* mohou vykazovat různé vzorce rentgenových a CT nálezů, přičemž nejčastěji jsou to vzorec vzdušného prostoru a bronchopneumonie. Tyto vzorce odpovídají rozvoji plicní konsolidace a ztlustění bronchiálních stěn, což vede k typickým změnám na zobrazovacích vyšetřeních, jako jsou skvrnité stíny nebo centrilobulární uzlíky. V některých případech se může vyvinout pleurální výpotek nebo lymfadenopatie, což naznačuje šíření infekce (Yagihashi et al., 2011).

Meningitida způsobená *Streptococcus pneumoniae* je závažné bakteriální onemocnění, které představuje významné zdravotní riziko. Přestože antibiotická léčba vedla k poklesu mortality, úmrtnost na tuto nemoc stále zůstává vysoká. *S. pneumoniae* je hlavním patogenem způsobujícím zánět ochranných membrán centrálního nervového systému. Pneumokoková meningitida je spojena s řadou dlouhodobých následků, včetně neurologických poruch, jako jsou záchvaty, senzoricko-motorické deficity a problémy s pamětí. Až polovina pacientů, kteří přežijí, trpí nějakým druhem neurologických komplikací. Mezi hlavní příznaky patří silné bolesti hlavy, které jsou přítomny u téměř 90 % případů, a ztuhlost šíje. Včasná diagnostika a zahájení léčby jsou klíčové pro minimalizaci rizika závažného poškození mozku a míchy. I přesto, že antibiotika umožnila účinnější léčbu, pneumokoková meningitida stále zůstává jednou z nejzávažnějších forem bakteriálních infekcí (Sharma et al., 2014).

2.3.3 Epidemiologie

Výskyt pneumokokových infekcí vykazuje výraznou sezónní variabilitu. Nejvyšší incidence je pozorována v zimních měsících a časném jaře, což souvisí s vyšší frekvencí respiračních virových infekcí, které mohou oslabit slizniční imunitu a usnadnit kolonizaci a invazi *S. pneumoniae*. Epidemie pneumokokových onemocnění bývají častější v obdobích zvýšené prevalence chřipky a dalších virových respiračních infekcí.

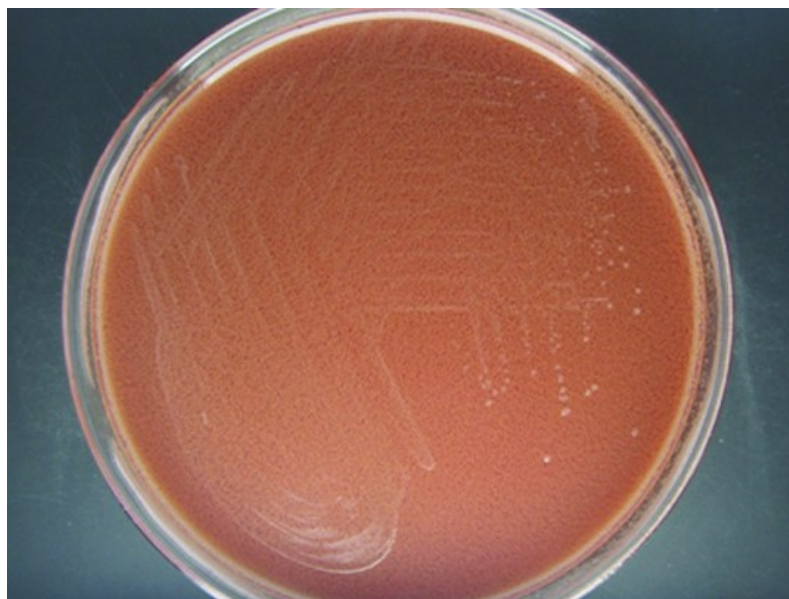
Geografická distribuce *S. pneumoniae* je celosvětová, ale incidence invazivních infekcí se liší v závislosti na regionálních faktorech, jako jsou úroveň vakcinace, dostupnost zdravotní péče a socioekonomické podmínky. Vyšší výskyt závažných pneumokokových infekcí je zaznamenán v rozvojových zemích, kde jsou omezené možnosti diagnostiky a léčby, a zároveň zde dochází k častějšímu přenosu v důsledku přeplněných životních podmínek.

Riziko invazivních pneumokokových infekcí je vyšší u dětí do pěti let, seniorů nad 65 let, osob s chronickými onemocněními (např. diabetes, chronická obstrukční plicní nemoc, srpkovitá anémie), imunosuprimovaných pacientů a jedinců s porušenou funkcí sleziny. Zvýšená náchylnost byla rovněž popsána u kuřáků a alkoholiků (Pettigrew, 2003).

Po zavedení pneumokokových konjugovaných vakcín (PCV) do očkovacích programů došlo k výraznému poklesu invazivních pneumokokových infekcí (IPD) způsobených vakcinačními sérotypy. Tento pokles však vedl k nárůstu infekcí způsobených neregistrovanými sérotypy (NVTs), což vedlo k jevu zvanému sérotypová náhrada. Po zavedení vakcíny PCV13 došlo k nárůstu incidence IPD způsobených NVTs, zejména v dětských a starších věkových skupinách. V některých zemích, jako je Velká Británie, byl pozorován dvojnásobný nárůst výskytu IPD způsobených NVTs od zavedení vakcíny PCV7, což podnítilo snahu vyvinout vakcíny pokrývající širší spektrum sérotypů. Tyto změny ve výskytu pneumokokových infekcí ukazují, že i nadále existuje potřeba neustálého monitorování serotypové distribuce a sledování účinnosti vakcín (Du et al., 2021).

2.4 *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae je gramnegativní bakterie kolonizující horní cesty dýchací, která může způsobovat široké spektrum infekcí. U této bakterie rozlišujeme kapsulární a nekapsulární kmeny. Kapsulární kmeny jsou dále děleny do šesti sérotypů (a–f), přičemž nejvýznamnější je *H. influenzae* typu b (Hib), který byl před zavedením očkování nejčastější příčinou invazivních infekcí, zejména u dětí. Naopak nekapsulární kmeny, označované jako netyповatelné *H. influenzae* (NTHi), jsou běžnými původci méně závažných, ale častých infekcí, jako jsou otitis media, sinusitida nebo exacerbace chronické obstrukční plicní nemoci (CHOPN). Po poklesu infekcí Hib se zvýšil výskyt invazivních NTHi infekcí, které mohou způsobit meningitidu, sepsi či pneumonii, především u pacientů se sníženou odolností vůči infekcím. Diagnostika *Haemophilus influenzae* zahrnuje kultivaci materiálu z postiženého místa (například sputum, krev, mozkomíšní mok), dále mikroskopii a molekulární metody, jako je PCR. Léčba invazivních infekcí vyžaduje podání antibiotik, nejčastěji cefalosporinů třetí generace. Pro prevenci je k dispozici očkování proti Hib, které významně snížilo výskyt těžkých forem infekce. V současnosti však neexistuje vakcína, která by chránila proti NTHi (Klibanov et al., 2022).



Obrázek 3: Kolonie *Haemophilus influenzae*

Obrázek zobrazuje růst *Haemophilus influenzae* na ovčím čokoládovém agaru. Po 18-24 hodinách inkubace při 35-37 °C v atmosféře s 5-10% CO₂ se na agaru objevují charakteristické malé (0,5-1 mm), hladké, průsvitné a konvexní kolonie s celistvým okrajem. Kolonie jsou jemné a rovnoměrně rozložené po povrchu agaru, což je typické pro tento typ bakterií ve vzorcích z dolních cest dýchacích (Shenoy et al., 2016).

2.4.1 Patogeneze a faktory virulence

Patogeneze infekcí způsobených netypovatelným *Haemophilus influenzae* (NTHi) v chronických plicních onemocněních zahrnuje několik mechanismů, které umožňují bakteriím kolonizovat dolní dýchací cesty a vyvolat přetrvávající infekci. NTHi narušuje mukociliární clearance (odstranění částic hlenem a řasinkami), využívá adhesiny pro přilnutí k buňkám dýchacích cest, tvoří biofilmy a vyhýbá se imunitním odpovědím hostitele. Bakterie také poškozují makrofágy a neutrofilů, čímž zhoršuje imunitní reakci. Tato schopnost přispívá k chronickým infekcím a zánětům, které vedou k poškození plicních struktur, zejména u pacientů s chronickými plicními onemocněními, jako je cystická fibróza nebo bronchiektázie (Chatziparasidis et al., 2023).

Patogeneze kapsulární formy *Haemophilus influenzae* zahrnuje šíření respiračními kapátkami a kolonizaci nosohltanu. U některých lidí může bakterie proniknout do hlubších tkání a způsobit závažná onemocnění, jako jsou meningitida, epiglottitida a artritida. Invazivní onemocnění jsou častější u *H. influenzae* typu b (Hib), kde kapsule chrání bakterii před imunitní odpovědí hostitele. Po zavedení vakcíny proti Hib došlo k výraznému poklesu

invazivních případů, zejména meningitidy, a snížení přenosu bakterie díky očkování. Tento pokles byl obzvláště patrný v zemích, kde byla vakcína široce dostupná. I přesto však i po zavedení vakcíny zůstávají v některých oblastech stále případy Hib onemocnění, zejména v rozvojových zemích (Harrison a Mason, 2015).

Haemophilus influenzae disponuje řadou faktorů virulence, které přispívají k jeho schopnosti způsobovat infekce. Mezi hlavní faktory patří polysacharidová kapsula, pili, tvorba biofilmů, IgA proteázy a faktor přežití makrofágů. Kombinace těchto faktorů virulence umožňuje *H. influenzae* uniknout imunitnímu systému hostitele, odolávat antimikrobiálními látkám a způsobovat chronické infekce.

Polysacharidová kapsula je jedním z nejdůležitějších faktorů virulence u kapsulovaných bakteriálních patogenů. Slouží jako hlavní obranný mechanismus proti imunitnímu systému hostitele, především chrání bakterii před fagocytózou leukocyty. Kromě toho kapsula napomáhá přilnutí bakterií k hostitelským tkáním, čímž podporuje vznik infekce. U netypovatelných kmenů *H. influenzae* (NTHi), které kapsulu nemají, jsou k infekci využívány jiné mechanismy, jako je přítomnost adhezních proteinů, například HMW1 a HMW2.

Pili a další povrchové proteiny hrají klíčovou roli při přilnutí *H. influenzae* na hostitelské buňky. Tvorba biofilmů, což jsou seskupení bakterií připojené k povrchům a chráněné slizovitou maticí, zvyšuje jejich odolnost vůči stresovým faktorům prostředí i antimikrobiálními látkám. IgA proteázy jsou enzymy produkované bakteriálními patogeny, které umožňují bakterii degradovat protilátky IgA1, jež hrají klíčovou roli v mukózní imunitě. Faktor přežití makrofágů (*msf*) je nově objevený faktor virulence *H. influenzae*, který pomáhá bakterii přežít fagocytózu makrofágy. Tento faktor je spojen s kmeny, které způsobují onemocnění, a je kódován genem *slrV* (Wen et al., 2020).

2.4.2 Klinické projevy

Klinické projevy infekcí způsobených *Haemophilus influenzae* zahrnují zejména zánět spojivek, akutní zánět středního ucha a akutní bakteriální sinusitidu. *H. influenzae* je jedním z nejběžnějších patogenů spojených s těmito nemocemi, přičemž zánět spojivek a otitis media (zánět středního ucha) tvoří častý klinický syndrom. Tento syndrom je pozorován především u dětí mladších dvou let. Dále může být *H. influenzae* přítomen i u akutní bakteriální sinusitidy, což ukazuje na možnou souvislost mezi těmito infekcemi (Hu et al., 2021).

Zánět spojivek způsobený *Haemophilus influenzae* je častým infekčním onemocněním, zejména u dětí. Klinicky se projevuje hnisavým výtokem z očí, otokem a zarudnutím spojivek, zvýšenou tvorbou slz a svěděním. Pacienti mohou pociťovat pocit cizího tělesa v oku, pálení, těžká víčka a v některých případech i fotofobii (přecitlivělost na světlo), pokud je postižena rohovka. Infekce může způsobit bolest a v některých případech i ztrátu zraku. Léčba zahrnuje aplikaci antibiotik, které pomáhají zkrátit dobu trvání nemoci a zmírnit symptomy. Zánět spojivek způsobený *H. influenzae* může být spojen i s jinými infekcemi, jako je například akutní zánět středního ucha (Kong et al., 2023).

2.4.3 Epidemiologie

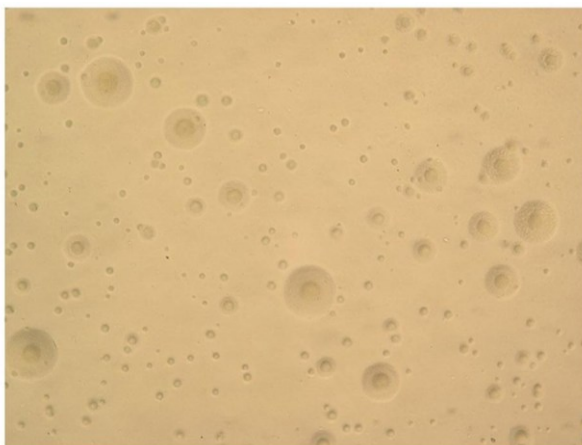
Zavedení konjugované vakcíny proti *Haemophilus influenzae* typu b (Hib) vedlo k výraznému poklesu výskytu invazivních onemocnění způsobených tímto typem, zejména u dětí. Nicméně, non-Hib kmeny, které postrádají kapsuli, i nadále přispívají k infekcím dýchacích cest a mohou způsobovat závažné zdravotní komplikace. Epidemiologie *H. influenzae* je ovlivněna mnoha faktory, včetně environmentálních podmínek, hustoty populace a klimatických změn, což podtrhuje význam neustálého sledování výskytu těchto kmenů pro efektivní prevenci a vývoj kontrolních strategií. Vyšší koncentrace obyvatel v určitých oblastech, například v uzavřených komunitách jako školy a zdravotnická zařízení, podporuje šíření *H. influenzae*, čímž se zvyšuje riziko infekcí (Zhou et al., 2022).

Po zavedení vakcíny proti sérotypu b (*Hib*) se *Haemophilus influenzae* netyповatelný (NTHi) stal nejběžnějším původcem invazivních infekcí. Mezi lety 2008 a 2019 byla v USA průměrná roční incidence těchto infekcí 1,3 na 100 000 obyvatel, přičemž u kojenců byla incidence vyšší (5,8 na 100 000) a u osob starších 80 let ještě vyšší (10,2 na 100 000). Infekce představují zvýšené riziko zejména pro novorozence, těhotné ženy a osoby infikované HIV. U těhotných žen může vést k potratu, což podtrhuje důležitost epidemiologického sledování a preventivních opatření, zvláště u těchto vysoce rizikových skupin (Oliver et al., 2023).

Klimatické faktory mají také zásadní vliv na šíření *Haemophilus influenzae*. Změny teploty, vlhkosti a dalších environmentálních podmínek ovlivňují prevalenci infekcí. Výskyt *H. influenzae* bývá častější v chladnějším počasí, přičemž zimní měsíce jsou spojeny s vyššími incidencemi respiračních onemocnění. Vyšší teploty mohou zvyšovat riziko výskytu infekcí, zatímco nižší teploty mohou v některých případech působit ochranně. Další faktory, jako vlhkost vzduchu, rychlost větru a přítomnost vodních ploch, rovněž podporují přežití a šíření bakterií v prostředí. Tento vliv klimatických změn zdůrazňuje potřebu sledování těchto faktorů pro efektivní prevenci a kontrolu infekce (Chen et al., 2022).

2.5 *Mycoplasma pneumoniae*

Mycoplasma pneumoniae je gramnegativní bakterie, která často způsobuje komunitní pneumonii, zejména u dětí školního věku a mladých dospělých. Infekce se šíří kapénkovou cestou a může mít různorodé klinické projevy, od mírného kašle až po těžké plicní komplikace. Standardní léčbou jsou makrolidová antibiotika, avšak rostoucí rezistence některých kmenů může terapii zkomplikovat. V těžších případech dochází k refrakterní pneumonii, kdy imunitní reakce zhoršuje průběh onemocnění, zde mohou pomoci kortikosteroidy. Pro diagnostiku se využívá PCR testování, sérologické metody a v některých případech i kultivace, přestože je časově náročná. Rychlá a správná diagnostika spolu s adekvátní léčbou hraje klíčovou roli v prevenci komplikací (Tsai et al., 2021).



Obrázek 4: *Kolonie Mycoplasma pneumoniae*

Kolonie Mycoplasma pneumoniae na pevném médiu mají typický „volské oko“ (fried egg) vzhled s hustším středem a méně hutným okrajem. Jsou drobné, nepravidelně granulované a často částečně zapuštěné do agaru. Kultivace této bakterie vyžaduje speciální médium obohacené o kvasničný extrakt a sérové složky, přičemž růst je pomalý a může trvat až několik týdnů (Saraya, 2016).

2.5.1 Patogeneze a faktory virulence

Patogeneze *Mycoplasma pneumoniae* začíná adhezí bakterií k epitelu dýchacích cest, což umožňuje jejich kolonizaci a přežití. Po přichycení dochází k poškození buněk uvolňováním toxických metabolitů a reaktivních forem kyslíku. Infekce vyvolává silnou imunitní odpověď, která zahrnuje produkci cytokinů a zánětlivé reakce, jež mohou vést k poškození tkání a chronickým změnám v plicích.

Kromě respiračních komplikací se u infekce *M. pneumoniae* projevují i neurologické, kardiovaskulární nebo renální komplikace, vznikající v důsledku imunitně zprostředkovaných mechanismů. Bakterie má schopnost unikat imunitnímu systému, což může vést k přetrvávání infekce a jejím opakovaným projevům (Chaudhry et al., 2016).

Mycoplasma pneumoniae disponuje několika faktory virulence, které přispívají ke schopnosti vyvolávat onemocnění. Mezi klíčové faktory patří cytoadheziny, glykolipidy, toxické metabolity, toxin CARDS (Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome toxin) a kapsulární polysacharidy. Tyto faktory umožňují mikroorganismu adherovat k hostitelským buňkám, narušovat jejich funkci a vyvolávat imunitní odpověď, čímž přispívají k rozvoji infekce.

CARDS toxin je klíčovým faktorem virulence, který způsobuje poškození buněk tím, že připojuje adenosindifosfát (ADP) k proteinům. Tento toxin se váže na specifické proteiny v dýchacím epitelu, jako je surfaktantový protein A nebo annexin A2, kde způsobuje změny v buněčných procesech. U *M. pneumoniae* tento toxin podporuje infekci tím, že narušuje normální funkci plicních buněk a zvyšuje zánětlivou reakci. Toxin aktivuje imunitní odpověď, což vede k uvolnění zánětlivých látek, jako jsou *IL-1β* a *IL-18*, které podporují zánět (Jiang et al., 2021).

Adheziny, konkrétně cytoadheziny, se nacházejí na povrchu bakterií a hrají klíčovou roli v adhezi k hostitelským buňkám. U *M. pneumoniae* jsou hlavními cytoadheziny proteiny P1 a P40/P90, které tvoří komplex s názvem *Nap*. Tento komplex usnadňuje přichycení bakterií na povrch hostitelských buněk a podporuje jejich pohyblivost. Cytoadheziny mají podobnou strukturu jako hemaglutininové proteiny, což naznačuje možný evoluční původ těchto proteinů a jejich význam při infekci (Vizarraga et al., 2021).

2.5.2 Klinické projevy

Mycoplasma pneumoniae je původcem komunitní atypické pneumonie, která může mít různorodé klinické projevy. Mezi typické příznaky patří horečka, kašel a mírná dušnost. Kašel bývá často suchý a může přetrvávat po dobu několika týdnů. Horečka je obvykle mírná, avšak u některých pacientů může být i vyšší. V některých případech se mohou objevit i další nespecifické symptomy, jako je únava, bolest hlavy nebo bolest svalů.

Respirační příznaky *M. pneumoniae* jsou často méně výrazné než u klasické bakteriální pneumonie, což vede k opožděné diagnostice. I přes mírnější průběh však může infekce vést k intersticiální pneumonii, která může být patrná na radiologických snímcích i při relativně

nenápadných klinických projevech. Kromě toho se mohou objevit i extrapulmonální příznaky, které zahrnují gastrointestinální obtíže, například nevolnost a zvracení, což může komplikovat diagnostiku (Khan et al., 2022).

U dětí se klinické projevy infekce *Mycoplasma pneumoniae* liší podle věku. Mezi nejčastější příznaky patří kašel, který je přítomen u většiny pacientů, a horečka, jež se vyskytuje přibližně u poloviny dětí. U mladších dětí do pěti let se častěji objevují známky dechové tísně, jako je tachypnoe, prodloužený výdech a retrakce hrudníku. Kromě toho mají tyto děti tendenci mít nižší saturaci kyslíkem ve srovnání se staršími dětmi. Extrapulmonální projevy, jako jsou kožní léze, se vyskytují u menší části pacientů, avšak jejich přítomnost může pomoci v diagnostice. U starších dětí je infekce často spojena se segmentální nebo lobární konsolidací plic, což lze pozorovat na radiologických snímcích. Celkově lze říci, že u dětí může *M. pneumoniae* způsobit široké spektrum příznaků, přičemž jejich intenzita a charakter se liší v závislosti na věku a závažnosti infekce (Ocak et al., 2022).

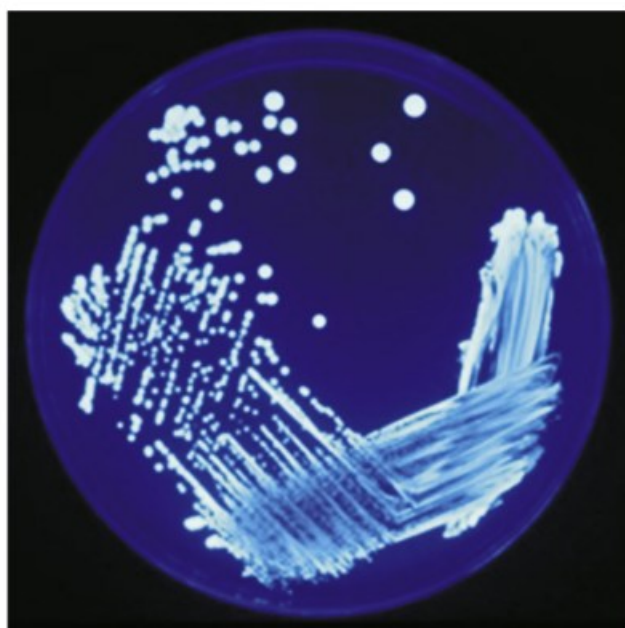
2.5.3 Epidemiologie

Infekce *Mycoplasma pneumoniae* se vyskytují endemicky v různých klimatických podmínkách po celém světě a každých několik let dochází k epidemiím. V Evropě byly zaznamenány epidemie v letech 2010–2012, 2014–2015 a 2015–2017. Přenos *M. pneumoniae* je běžný v rodinách, školách, vojenských základnách, pečovatelských domech a dalších uzavřených komunitách. Přestože se reálná prevalence infekce ve většině zemí systematicky nesleduje, některé státy sbírají laboratorní hlášení nebo mají zavedené národní monitorovací systémy. Celosvětová data naznačují, že opatření zavedená během pandemie COVID-19, jako uzavření škol a omezení kontaktů, vedla k významnému poklesu detekovaných případů *M. pneumoniae*, což potvrzuje důležitost sociálních kontaktů při šíření tohoto patogenu (Meyer Sauteur et al., 2022).

Epidemiologická studie provedená ve Wu-chanu mezi dětmi v období od října 2020 do března 2022 se zaměřila na výskyt *Mycoplasma pneumoniae*. Ze 1259 analyzovaných vzorků bylo pomocí qPCR zjištěno, že 36,6 % dětí bylo infikováno tímto patogenem. Výsledky ukazují, že většina případů se týkala předškolních dětí, přičemž infekce u nejmladších (1–24 měsíců) měla obvykle mírnější průběh. Naopak u školních dětí (6–11 let) byly častější těžší formy onemocnění. Infekce se nejčastěji vyskytovala v zimních a časně jarních měsících. Kromě běžných respiračních příznaků, jako jsou horečka a paroxysmální kašel, se u některých dětí objevily i extrarespirační symptomy, například gastrointestinální potíže (Xu et al., 2024).

2.6 Legionella pneumophila

Legionella pneumophila je gramnegativní aerobní bakterie, která se přirozeně vyskytuje ve sladkovodním prostředí, kde může žít volně nebo v biofilmech. Je známa jako původce legionelózy, která se vyskytuje ve dvou formách – mírnější pontiacké horečky a závažnější legionářské nemoci, jež se projevuje akutním zápallem plic. Bakterie je schopna přežít a množit se intracelulárně uvnitř prvoků, jako jsou *Acanthamoeba* nebo *Naegleria*, což jí poskytuje ochranu před nepříznivými podmínkami. K přenosu *L. pneumophila* dochází inhalací kontaminovaného aerosolu z vodních systémů, jako jsou klimatizace nebo vířivky, přičemž po vdechnutí infikuje plicní makrofágy, kde se množí a pomocí sekrečních systémů uniká imunitní odpovědi, až nakonec ničí hostitelskou buňku a šíří se dál. Lidský organismus není jejím primárním hostitelem, avšak díky adaptacím na život uvnitř prvoků dokáže infikovat i lidské buňky, zejména makrofágy. Přímý přenos mezi lidmi zatím nebyl prokázán (Ayesha et al., 2023).



Obrázek 5: Kolonie *Legionella pneumophila*

Obrázek zobrazuje kolonie bakterie *Legionella pneumophila* rostoucí na BCYE agaru (*Buffered Charcoal Yeast Extract agar*), což je selektivní médium používané pro kultivaci této bakterie, neboť obsahuje cystein a železo nezbytné pro její růst. Kolonie mají hladký povrch, perleťový lesk a šedobílou až modrozelenou barvu (Subbaram et al., 2017).

2.6.1 Patogeneze a faktory virulence

Patogeneze *L. pneumophila* začíná adhezí bakteriálních buněk k hostitelským buňkám, po níž následuje intracelulární replikace a šíření infekce. Po vstupu do hostitelských buněk ovlivňuje jejich funkce a vytváří si ochranné prostředí, které poskytuje živiny potřebné pro její růst. Mezi mechanismy podílející se na tomto procesu patří apoptóza, dynamika mitochondrií a biosyntéza fosfolipidů. Bakterie zároveň ovlivňuje řadu eukaryotických buněčných procesů a inhibuje syntézu proteinů. *L. pneumophila* kóduje proteiny podobné eukaryotickým, což jí umožňuje manipulovat s hostitelskými buňkami (Iliadi et al., 2022a).

Mezi hlavní virulentní faktory patří schopnost přecházet mezi různými fázemi infekce, což zahrnuje transformaci z avirulentní fáze (replikační fáze) na virulentní fázi (transmisivní fáze). V této fázi bakterie zvyšují svou pohyblivost a exprimují důležité virulentní proteiny, jako je bičík a sekreční systémy, které jsou klíčové pro invazi do hostitelských buněk. Dalším významným faktorem je *Mip* (Macrophage Infectivity Potentiator), což je membránový protein, který se podílí na adhezí a invazi do makrofágů. *L. pneumophila* také využívá různých povrchových struktur, jako jsou lipopolysacharidy, pili, a vnější membránové proteiny, které usnadňují připojení k hostitelským buňkám. Tyto faktory virulence, včetně schopnosti přizpůsobit se různým hostitelským prostředím, jsou klíčové pro patogenitu a umožňují jí přežít a množit se jak v protozoích, tak v lidských makrofázích (Yang et al., 2023).

Protein *Mip* je membránově vázaný virulentní faktor bakterie *Legionella pneumophila*, který funguje jako enzym napomáhající změnám v prostorovém uspořádání bílkovin. Tento protein zvyšuje schopnost bakterie přežít a množit se uvnitř makrofágů, tedy buněk imunitního systému, a zároveň jí pomáhá šířit se v tkáních hostitele. Studie prokázaly, že pokud je aktivita proteinu *Mip* snížena, bakterie se hůře replikuje v hostitelských buňkách, což potvrzuje jeho význam pro infekci (Nikolka et al., 2023).

Sekreční systém typu IV hraje klíčovou roli v její schopnosti infikovat hostitelské buňky. Tento složitý systém se skládá z 27 komponent, které jsou umístěny v vnitřní a vnější membráně bakteriální buněčné stěny. Systém umožňuje bakteriím vpravit do cytosolu hostitelské buňky více než 300 efektorových proteinů. Tyto proteiny koordinovaně ovlivňují různé buněčné procesy, včetně udržování integrity membrány replikace vakuoly, autofagie, biosyntézy proteinů a apoptózy hostitelské buňky. Tímto způsobem bakterie vytváří příznivé podmínky pro svou replikaci v makrofázích a dalších buněčných typech hostitele (Kowalczyk et al., 2021).

Sekreční systém typu II (T2SS) je zásadní pro ekologii těchto bakterií a jejich schopnost vyvolávat infekce. Tento systém, jenž je přítomen u mnoha gramnegativních bakterií, umožňuje sekreci specifických bílkovin do vnějšího prostředí nebo do hostitelských buněk. U *L. pneumophila* je T2SS zodpovědný za produkci více než 25 různých bílkovin, včetně enzymů s lipolytickou, proteolytickou a ribonukleázovou aktivitou. Tyto bílkoviny umožňují bakteriím přežít v různých prostředích, včetně sladkovodních nádrží, kde mohou přežívat ve formě planktonu či biofilmu. V lidském těle T2SS podporuje schopnost bakterie infikovat alveolární makrofágy a další buňky, jako jsou fibroblasty nebo epitelové buňky plicních sklípků. Enzymy, jako proteázy, fosfolipázy nebo aminopeptidázy, pomáhají bakteriím získávat živiny a zároveň přispívají k destrukci plicní tkáně během infekce. Navíc T2SS hraje roli v potlačování vrozené imunitní odpovědi hostitele tím, že inhibuje produkci prozánětlivých cytokinů (Małek et al., 2021).

2.6.2 Klinické projevy

Klinické příznaky infekce *Legionella pneumophila* se mohou značně lišit a často nejsou specifické. Nejčastěji se onemocnění projevuje horečkou, kašlem a dušností, přičemž u většiny pacientů se objevuje i výrazná únava. Bolesti svalů byly podle výsledků studie častější u pacientů s komunitně získanou pneumonií než u těch s nemocniční formou. K dalším možným příznakům patří bolest na hrudi, bolest hlavy, zmatek (změny vědomí), ztráta chuti k jídlu, bolest břicha a výjimečně také průjem. Vzhledem k tomu, že projevy infekce jsou podobné jiným formám pneumonie, může být stanovení diagnózy bez cílených testů obtížné.

Rozdíly v klinickém obrazu se mohou projevit i v laboratorních hodnotách. Například u pacientů s komunitní formou pneumonie způsobenou *L. pneumophila* byly zjištěny vyšší hladiny CRP a kreatin kinázy (CK), což může naznačovat intenzivnější zánětlivou odpověď. Naopak nemocniční formu provázely vyšší hodnoty jaterních enzymů (ALT a AST), bilirubinu a poruchy srážlivosti krve, což může souviset se závažnějším celkovým stavem pacientů. Celkově se tedy infekce způsobená *Legionella pneumophila* může manifestovat širokou škálou příznaků, které se mohou lišit v závislosti na místě a způsobu nákazy (Turan Ozden a Ucar, 2024).

2.6.3 Epidemiologie

Legionella pneumophila je běžně přítomná ve vodních zdrojích i uměle vytvořených vodních systémech. Mezi hlavní zdroje přenosu patří jak pitná voda, například ze sprch

a kohoutků, tak nepitné zdroje, jako jsou fontány, lázně a chladicí věže. Změny klimatu přispívají k jejímu šíření, zejména ve stárnoucí vodovodní infrastruktuře. Bylo zjištěno, že kabinové vzduchové filtry automobilů mohou být dalším místem, kde se bakterie usazují, což představuje potenciální riziko nákazy. Zajímavé je i zjištění, že *L. pneumophila* byla izolována z řecké zahradní zeminy, což naznačuje, že půda může být dalším rezervoárem této bakterie. Infekce se často objevují v rekreačních a hotelových oblastech, kde jsou spojovány především s kontaminovanými vodními systémy.

Onemocnění způsobené *L. pneumophila* se může vyskytovat jako jednotlivé případy, ale může také vést k epidemiím. Opakovaně jsou hlášeny případy související s cestováním a pobytem na lodích, přičemž hotely bývají hlavním zdrojem nákazy. Zvýšené riziko nákazy bylo popsáno i u některých profesí, mezi které patří zdravotničtí pracovníci, zaměstnanci hotelů, řidiči, potápěči nebo zubní lékaři. Studie ukázaly, že lidé pracující v těchto odvětvích mají často vyšší hladinu protilátek proti *L. pneumophila*, což naznačuje jejich častější kontakt s bakterií (Iliadi et al., 2022b).

V posledních letech byl v Evropě i ve Spojených státech amerických zaznamenán rostoucí trend výskytu legionelózy, přičemž více než 90 % klinických případů je spojeno s druhem *Legionella pneumophila*. Zvláště vysoká míra kontaminace zdravotnických zařízení byla hlášena v Itálii, kde dosahovala více než 79 %. Infekce touto bakterií může mít vážný průběh, zejména u lidí s oslabenou imunitou, u nichž může být úmrtnost mezi 5 až 30 %. Pro sledování epidemiologie lze využít molekulární metody, které pomáhají pochopit genetickou rozmanitost této bakterie a její schopnost způsobovat infekce (Monistero et al., 2024).

3 DIAGNOSTICKÉ METODY A DETEKCE

Pro správné nastavení léčby je nezbytné určit, s jakým patogenem, případně s jakými patogeny, má daný pacient co do činění. V tomto ohledu hraje klíčovou roli diagnostika, jejíž rychlost a přesnost mohou zásadně ovlivnit průběh onemocnění a v některých případech dokonce zachránit život. Zatímco dříve se využívaly především metody klasické mikrobiologie, tak v posledních letech se do popředí dostávají moderní molekulární metody založené na detekci nukleových kyselin, jako je polymerázová řetězová reakce (PCR). Studie z roku 2021 ukazuje, že molekulární testování dokáže odhalit až o 23,6 % více patogenů než tradiční kultivační techniky, což potvrzuje jejich rostoucí význam v diagnostice. (Lin et al., 2022). Těmto metodám bych se ráda věnovala v následujících kapitolách.

3.1 Úvod do diagnostiky

Molekulární diagnostika dnes hraje důležitou roli v rozpoznávání infekčních nemocí, hlavně proto, že je rychlejší a přesnější než klasické metody, jako je např. kultivace. Kultivační metody sice stále patří mezi základní postupy, ale jsou často časově náročné a ne vždy spolehlivé – například když je v materiálu jen malé množství bakterií. Molekulární techniky, jako je PCR a její různé varianty, dokážou odhalit i velmi nízké množství genetického materiálu patogenu, a proto se staly běžnou součástí laboratorní diagnostiky. I když tyto metody přinášejí spoustu výhod, neměly by úplně nahrazovat klasické přístupy. Vysoká citlivost PCR může být někdy pro diagnostiku komplikace a proto je vhodné kombinovat tyto metody s klasickými, aby byla diagnostika co nejpřesnější a dávala smysl i ve spojení s příznaky pacienta (Freiberger, 2017).

Kultivační metody zůstávají základním nástrojem v mikrobiologické diagnostice, zejména při identifikaci a charakterizaci bakteriálních patogenů. Tyto metody umožňují izolaci mikroorganismů na specifických živných médiích, jako jsou krevní agar, čokoládový agar nebo selektivní média, která podporují růst konkrétních bakterií a inhibují růst jiných. Například krevní agar je často využíván pro detekci hemolytických vlastností bakterií, což napomáhá při jejich identifikaci. Přestože kultivační metody poskytují cenné informace o morfologii a biochemických vlastnostech mikroorganismů, jejich hlavní nevýhodou je časová náročnost, neboť růst bakterií může trvat od 24 do 72 hodin, a v některých případech i déle. Navíc některé patogeny, jako například *Mycoplasma pneumoniae*, jsou obtížně kultivovatelné nebo vyžadují speciální podmínky, což omezuje efektivitu těchto metod v rutinní diagnostice (Váradí et al., 2017). Vzhledem k tomu, že podrobné zpracování kultivačních metod by značně rozšířilo rozsah této práce, zaměřuji se dále především na

molekulárně biologické metody, které představují moderní a efektivní přístup k diagnostice respiračních patogenů.

3.2 Obecné principy molekulární diagnostiky

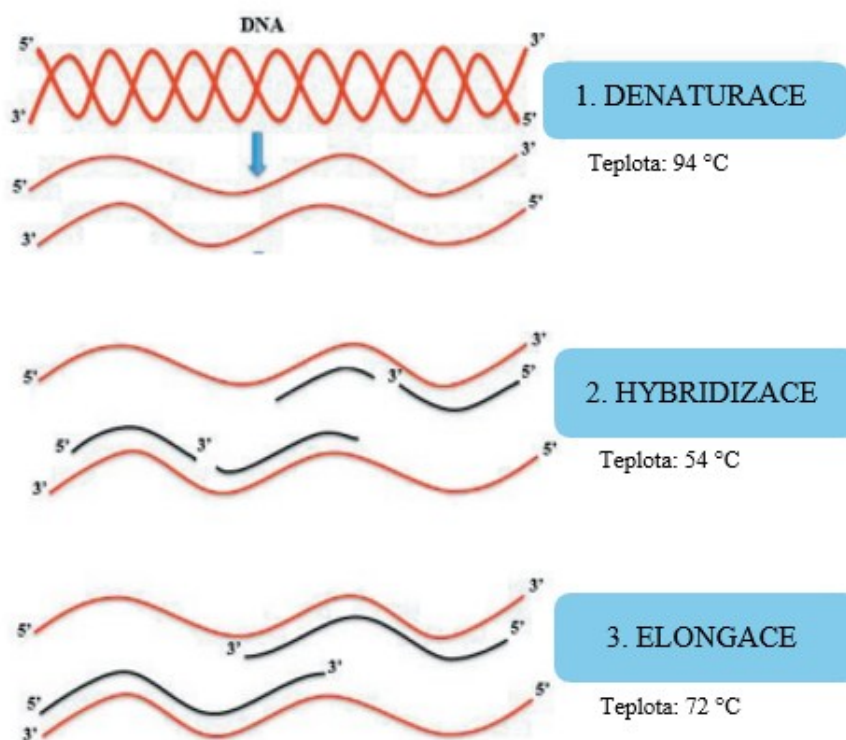
Molekulární diagnostika je oborem, který se zabývá identifikací genetické informace s cílem odhalit přítomnost nemocí nebo predispozic na úrovni DNA či RNA. Její základní principy vycházejí z izolace nukleových kyselin, jejich amplifikace a následné detekce specifických sekvencí. Mezi nejčastěji využívané metody patří polymerázová řetězová reakce (PCR) a její kvantitativní varianta real-time PCR (qPCR), které umožňují citlivé a rychlé stanovení i velmi nízkých koncentrací genetického materiálu. Hybridizační metody zase spoléhají na vazbu značených sond ke komplementárním sekvencím, což umožňuje specifickou detekci cílové oblasti. Sekvenace pak poskytuje přesný přehled o nukleotidovém složení, a je proto nepostradatelná při analýze mutací nebo variací v genomu, případně pro identifikaci izolátů. Tyto techniky tvoří základ moderní molekulární diagnostiky a umožňují nejen rychlou detekci onemocnění, ale i individualizaci léčby na základě genetického profilu pacienta (Rolando et al., 2024).

3.2.1 PCR

PCR, neboli polymerázová řetězová reakce, je důležitá metoda v molekulární biologii, která se používá ke znásobení určitého úseku DNA. Význam PCR dokazuje i to, že její objevitel Kary Mullis za ni v roce 1993 obdržel Nobelovu cenu za chemii. Od té doby se tato metoda uplatnila v celé řadě oborů – používá se nejen v medicíně, ale také v zemědělství nebo kriminalistice. Díky své spolehlivosti, nízkým nákladům a dobře zavedenému postupu je považována za základní nástroj v genetickém výzkumu. Velkou roli sehrála i při sestavení první verze lidského genomu na začátku 90. let. Přesto má i PCR své limity, třeba při práci s dlouhými nebo složitými úseky DNA, kde se zkouší různé přísady pro zlepšení výsledků (Karunanathie et al., 2022a).

PCR umožňuje selektivní amplifikaci specifických fragmentů DNA prostřednictvím *in vitro* replikace. Tento proces se skládá ze tří fází: denaturace, hybridizace a elongace. Během denaturace se dvouvláknová DNA zahřívá na vysokou teplotu (94 °C), což vede k separaci obou vláken, protože vodíkové vazby mezi nimi se při této teplotě rozpadnou. V druhé fázi, hybridizaci, se teplota sníží (mezi 40 a 70 °C), což umožní primerům (krátkým sekvencím komplementárním k templátové DNA) vázat se na cílové oblasti DNA. Třetí fáze, elongace, probíhá při teplotě 72 °C, kdy DNA polymeráza katalyzuje syntézu komplementárního vlákna DNA za využití dNTPs přítomných v reakční směsi. Polymerázy

používané v PCR jsou termostabilní enzymy, které pocházejí z termofilních mikroorganismů. Původně se používala Taq polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, dnes se však běžně využívají rekombinantní a modifikované varianty s vyšší přesností nebo rychlostí syntézy. Tento cyklus se opakuje několikrát, přičemž každé opakování teoreticky zdvojnásobí množství amplifikované DNA. Po 20 až 40 cyklech vzniká dostatečné množství DNA pro následné analýzy a většinou dochází k vyčerpání reakční směsi (Kadri, 2020).



Obrázek 6: Základní princip polymerázové řetězové reakce (PCR)

Obrázek schematicky zobrazuje tři hlavní kroky PCR cyklu: denaturaci, hybridizaci a extenzi. Během denaturace se dvouřetězcová DNA rozplete zahřátím. V kroku hybridizace se specifické primery navážou na jednotlivá vlákna DNA při nižší teplotě. Nakonec, během extenze, DNA polymeráza prodlouží primery a vytvoří nové komplementární řetězce DNA při optimální teplotě. Opakováním těchto cyklů dochází k exponenciálnímu zmnožení cílové DNA sekvence (Ehtisham et al., 2016).

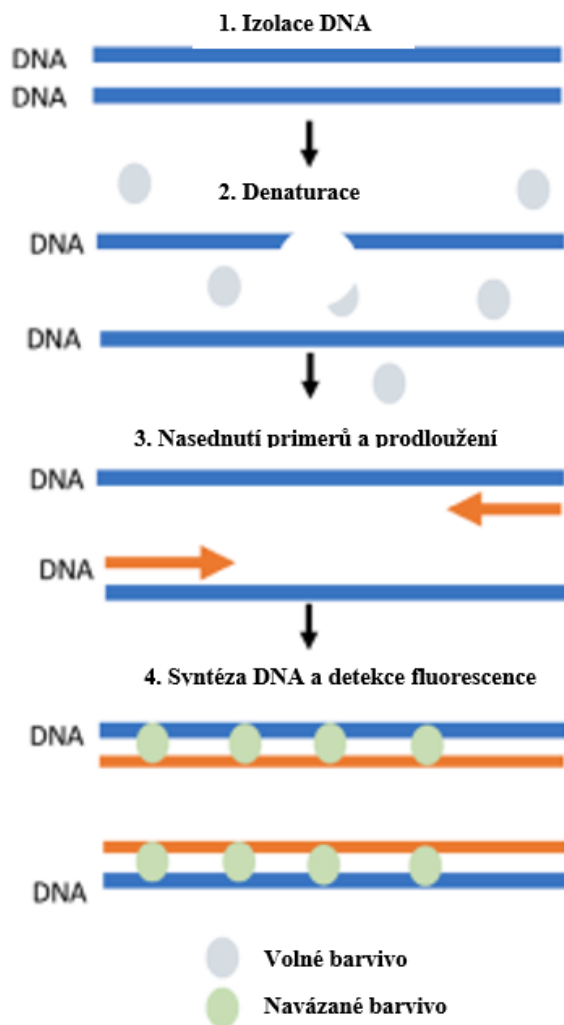
Úspěšné provedení polymerázové řetězové reakce závisí na přesně definovaném složení reakční směsi, která obsahuje několik základních komponent. Mezi nejdůležitější patří templátová DNA (izolovaná DNA, sloužící jako šablona pro polymerázu, podle níž je syntetizováno komplementární vlákno), specificky navržené primery, DNA polymeráza, deoxyribonukleotid trifosfáty (dNTPs) a ionty hořčíku (Mg^{2+}), případně další aditiva. Celé

prostředí je udržováno v pufovaném roztoku. Každá složka hraje specifickou roli – primery určují cílový úsek DNA k amplifikaci, dNTPs slouží jako stavební kameny nově syntetizované DNA, a Mg^{2+} ionty jsou nezbytné pro aktivitu polymerázy i stabilitu reakce (Karunanathie et al., 2022b).

3.2.2 Real-time PCR (qPCR)

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR), známá také jako real-time PCR, je moderní molekulárně-biologická metoda, která umožňuje přesné měření množství specifických nukleových kyselin ve vzorku. Tato technika vychází z klasické PCR, ale na rozdíl od ní dokáže nejen detekovat přítomnost DNA nebo RNA, ale také kvantifikovat její množství v reálném čase. Díky své přesnosti a univerzálnosti nachází qPCR široké využití, a to od výzkumu genové exprese a buněčných mechanismů až po diagnostiku onemocnění, kde slouží například k detekci patogenů nebo sledování účinnosti léčby. Uplatnění nachází i v oblasti farmakogenetiky, kde pomáhá odhalit genetické varianty ovlivňující reakci pacientů na léky. I přes vysokou citlivost a přesnost qPCR závisí výsledky na správném provedení celého procesu, od přípravy vzorku až po interpretaci dat, což může ovlivnit spolehlivost testu (Bustin, 2024).

Během PCR amplifikace se používají fluorescenční látky, které signalizují množství amplifikovaného DNA. Nejčastěji se k tomu používá fluorescenční barvivo, jako je SYBR Green, které se váže na dvoušroubovici DNA a emituje fluorescenci, nebo hydrolyzační sondy, které se štěpí polymerázou a tím uvolňují fluorescenční signál. V průběhu PCR cyklů roste fluorescenci v závislosti na množství amplifikovaného DNA. Tento signál je detekován v každém cyklu, což umožňuje stanovení počtu cyklů (Ct nebo Cq), při kterém fluorescenci překročí předem nastavený práh. Tento bod je klíčový pro kvantifikaci původního množství DNA v reakčním vzorku. Metoda qPCR umožňuje vysoce citlivou a specifickou detekci, což je ideální pro různé aplikace, jako je stanovení počtu kopií konkrétního genetického markeru v DNA (Adams, 2020).



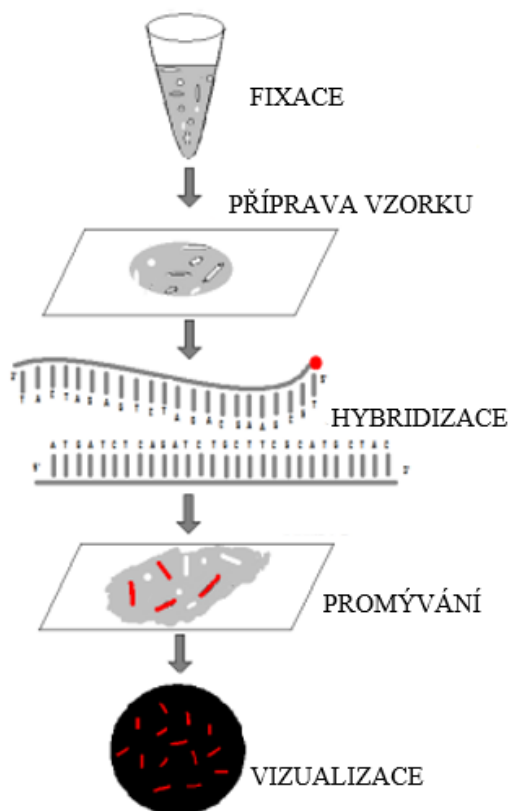
Obrázek 7: Základní princip kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR)

Na obrázku je znázorněn princip kvantitativní PCR (qPCR). Nejprve se ze vzorku izoluje DNA, která je následně při vysoké teplotě denaturována – její dvě vlákna se oddělí. Po ochlazení se ke specifickým úsekům navážou primery, krátké úseky DNA, které označují začátek nové syntézy. DNA polymeráza pak začne vytvářet nové vlákno. Během tohoto procesu se používá fluorescenční barvivo, které se váže na vzniklou dvouvláknovou DNA. Barvivo nenavázaná na dvouvláknovou DNA má nízkou míru fluorescence, zatímco navázané barvivo (na obrázku zeleně) má vysokou fluorescenci. Jak se množství DNA zvyšuje, roste i intenzita fluorescence, což umožňuje průběžné sledování reakce (Adams, 2020).

3.2.3 Hybridizační metody

Hybridizace nukleových kyselin je proces, při kterém se k sobě navážou dva řetězce DNA nebo RNA na základě komplementarity jejich bází. Výsledkem je stabilní dvoušroubovice, podobná té, jakou známe z přirozené struktury DNA. Tento princip se využívá v celé řadě moderních biotechnologických metod, jako je například PCR, DNA mikročipy nebo molekulární sondy. Díky tomu můžeme zjistit, jestli je ve vzorku přítomen určitý gen, virus nebo jiný specifický úsek nukleové kyseliny. Aby mohla hybridizace proběhnout efektivně, je obvykle nutné DNA nejprve denaturovat, tedy oddělit její dvě vlákna zahřátím. Následným pomalým ochlazením se umožní znovuvytvoření dvoušroubovicového útvaru mezi komplementárními sekvencemi. Tento krok je zásadní pro správné navázání sondy na cílovou nukleovou kyselinu. Příliš rychlé ochlazení může vést ke vzniku intramolekulárních struktur, které hybridizaci brání. V rámci zefektivnění celého procesu a zrychlení analytických metod se proto hledají alternativní způsoby, jak hybridizaci provádět bez nutnosti teplotních změn. K tomuto účelu se využívají specifické soli, organická rozpouštědla nebo nanomateriály, které zvyšují rychlost a stabilitu reakce i při nižších teplotách (Wong et al., 2021).

Jednou z významných metod využívajících princip hybridizace nukleových kyselin je fluorescence in situ hybridizace (FISH). Tato cytogenetická technika umožňuje přesnou detekci a lokalizaci specifických sekvencí DNA nebo RNA přímo v buňkách či tkáních. Díky vysoké specificitě a možnosti vizualizace cílových oblastí pomocí fluorescenčně značených sond se FISH stala zlatým standardem v diagnostice genetických a nádorových onemocnění. V oblasti detekce patogenů dýchacích cest je tato metoda využívána zejména pro identifikaci virových a bakteriálních agens přímo ve vzorcích respiračních epitelii, přičemž umožňuje nejen potvrdit přítomnost infekčního činitele, ale i sledovat jeho lokalizaci v buněčné struktuře. Sondy mohou být navrženy tak, aby rozeznaly specifické genové sekvence jednotlivých mikroorganismů, což zajišťuje vysokou míru senzitivity a specificity. V posledních letech se v rámci zefektivnění celého procesu zkoumají možnosti integrace FISH s mikrofluidními technologiemi, které přinášejí výhody v podobě nižší spotřeby reagensů, zkrácení doby hybridizace a možností automatizace, čímž se zvyšuje její využitelnost i v rutinní diagnostice (Huber et al., 2018).



Obrázek 8: *Obecný postup FISH metody*

Obrázek ilustruje základní kroky metody fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Proces zahrnuje fixaci a následnou přípravu vzorku. Poté dochází k hybridizaci, kdy se fluorescenčně značená oligonukleotidová sonda váže na komplementární cílovou sekvenci nukleové kyseliny (DNA nebo RNA) v imobilizovaných buňkách. Po promytí pro odstranění nepřivázaných sond je signál detekován pomocí fluorescenční mikroskopie, což umožňuje vizualizaci a identifikaci cílových mikroorganismů na základě fluorescence sondy (Mahmoud, 2012).

3.2.4 Sekvenace

Sekvenace DNA je základní metodou pro analýzu genetického materiálu, která umožňuje detailní studium struktury a funkce genů. Tato technologie, která se vyvinula během několika desetiletí, je dnes klíčová nejen v oblasti základního výzkumu, ale i v klinické diagnostice. První metody sekvenace, jako je Sangerova metoda, umožnily číst sekvence DNA v laboratořích, ale s postupujícím vývojem technologií se objevily nové, efektivnější metody. V současnosti jsou jedním z nejdůležitějších nástrojů pro detekci patogenů v oblasti dýchacích cest technologie sekvenace nové generace (NGS), které umožňují rychlou a detailní analýzu genomu mikroorganismů. Tento pokrok umožnil vědcům analyzovat celé mikrobiomy a identifikovat patogeny, které se tradičními metodami detekce nemusí podařit odhalit. Vývoj

sekvenačních technologií, včetně zlepšení přesnosti a snížení nákladů, vedl k jejich širšímu využití nejen ve výzkumu, ale i v klinických aplikacích, jako je diagnostika infekčních nemocí způsobených viry a bakteriemi (Gu et al., 2019).

Sekvence nové generace (NGS) představuje revoluční technologii, která významně změnila přístup k genomickému výzkumu. Tento pokrok umožňuje rychlé a paralelní sekvenování milionů fragmentů DNA, což poskytuje hluboké a komplexní informace o struktuře genomu, genetických variacích, expresi genů a epigenetických modifikacích. Hlavní výhodou NGS je její vysokokapacitní povaha, která umožňuje provádět analýzy v kratším čase ve srovnání s tradičními metodami, jako je Sangerova sekvence. NGS technologie, jako jsou platformy Illumina, Pacific Biosciences nebo Oxford Nanopore, otevřely nové možnosti pro výzkum v různých oblastech, včetně genomiky, metagenomiky, diagnostiky infekčních onemocnění, analýzy mikrobiomů a výzkumu vzorců genetických nemocí. Tyto technologie umožňují nejen analýzu celých genomů, ale také vysoce detailní studium genové exprese a epigenetických změn, což je klíčové pro pochopení komplexních biologických procesů (Satam et al., 2023).

Illumina technologie pro NGS využívá metodu sekvenování na základě fluorescenčně označených reverzibilních terminátorů (SBS – Sequencing by Synthesis). Tento proces začíná amplifikací DNA knihoven pomocí PCR, která probíhá přímo na sekvenačním čipu. Během sekvenování se jednotlivé nukleotidy, označené fluorescenčními barvami a spojené s reverzibilním terminátorem, postupně začleňují do replikující se DNA řetězce. Každý cyklus sekvenování vede k záznamu fluorescenčního signálu, což umožňuje identifikaci sekvence. Po začlenění nukleotidu je terminátor odstraněn, což umožní připojení dalšího nukleotidu. Technologie Illumina umožňuje i párové sekvenování, kde jsou oba konce DNA fragmentu sekvenovány, což poskytuje vysokou kvalitu dat a zlepšuje pokrytí a rozlišení polymorfizmů. Vysoká přesnost této metody, s chybovostí okolo 0,1 %, ji činí velmi spolehlivou pro různé genomické analýzy, včetně detekce patogenů v dýchacích cestách, kde je důležitá detailní analýza genetických variant (Hu et al., 2021).

3.3 Detekce jednotlivých patogenů

3.3.1 Bordetella pertussis

Včasné a přesné rozpoznání infekce způsobené *Bordetella pertussis* je klíčové pro správnou klinickou léčbu i omezení šíření nákazy. V současnosti se využívá více diagnostických metod, mezi které patří kultivace, sérologické testy a různé formy PCR. Sérologické vyšetření vyžaduje porovnání dvou vzorků odebraných v různých fázích onemocnění, což není vždy snadno proveditelné, zvláště u dětí. PCR metody, zejména real-time kvantitativní PCR (qPCR), se ukazují jako vhodnější alternativa – umožňují rychlou detekci genetického materiálu patogenu bez ohledu na stadium infekce nebo očkovací status pacienta. Moderní multiplexní přístupy, jako např. BioFire Respiratory Panel 2 plus (RP2 plus), dokáží současně identifikovat *B. pertussis* spolu s dalšími respiračními patogeny, což je přínosné zejména v případech koinfekcí. Tyto metody tedy představují efektivní nástroj pro rychlou laboratorní diagnostiku pertuse, a tím i pro rozhodování o dalším terapeutickém postupu (Li et al., 2023).

Real-time PCR (qPCR) je v současnosti nejpoužívanější metodou pro laboratorní detekci *Bordetella pertussis*, a to díky své vysoké citlivosti a rychlosti oproti klasické kultivaci. Detekce je založena na amplifikaci inserční sekvence *IS481*, která se vyskytuje ve více kopiích v genomu této bakterie. Pro potvrzení přítomnosti *B. pertussis* se zároveň sleduje přítomnost specifického genu *ptxS1*, což umožňuje přesně identifikovat tuto bakterii a odlišit ji od podobných druhů, které také mohou nést *IS481*.

Detekci *Bordetella pertussis* pomocí real-time PCR začneme extrakcí nukleových kyselin z 200 µl vzorku horních cest dýchacích. Nukleové kyseliny izolujeme pomocí vhodného extrakčního kitu a eluujeme do objemu kolem 50 až 100 µl elučního pufru. PCR reakční směs připravíme v celkovém objemu 10 až 25 µl, do které přidáme 4 až 10 µl extrahované DNA, primery a sondy pro cílové sekvence *IS481* a *ptxS1* a vnitřní pozitivní kontrolu. Amplifikaci provádíme v reálném čase na PCR přístroji s programem zahrnujícím 40 až 50 cyklů při teplotách kolem 95 °C pro denaturaci a 57 až 60 °C pro annealing a extenzi. Výsledky interpretujeme podle hodnoty Ct, kde Ct hodnoty obou cílů *IS481* a *ptxS1* nižší než 35 signalizují přítomnost *B. pertussis*. Při Ct hodnotách mezi 35 a 40 je vhodné provést opakování testu pro potvrzení výsledku. Pro zajištění kvality testu zahrneme vždy pozitivní a negativní kontroly. Celý proces vyžaduje přísné dodržování laboratorních standardů a správnou manipulaci se vzorky, aby se minimalizovalo riziko kontaminace a falešně pozitivních či negativních výsledků (Cole et al., 2024).

3.3.2 *Streptococcus pneumoniae*

Klasická diagnostika je založena na kultivaci, která sice představuje zlatý standard, ale je časově náročná a její výsledky mohou být ovlivněny přítomností běžné mikroflóry, především jiných alfa-hemolytických streptokoků. Alternativou k těmto tradičním metodám jsou molekulárně-biologické techniky, mezi nimiž v posledních letech získávají na významu qPCR a LAMP (loop-mediated isothermal amplification). Obě metody umožňují rychlou a specifickou detekci přítomnosti patogenu přímo ve vzorcích z dýchacích cest. Zatímco qPCR vyžaduje cyklické změny teplot, LAMP je schopna amplifikace při konstantní teplotě, což usnadňuje její využití i mimo plně vybavené laboratoře.

K detekci *Streptococcus pneumoniae* pomocí LAMP metody se odebraný vzorek sputa nejprve ošetří trypsinem a postupně centrifuguje, přičemž získaný sediment se resuspenduje v destilované vodě a denaturuje při 56 °C a následně 95 °C. Reakční směs o objemu 50 µl obsahuje specifické primery pro gen *lytA*, Bst DNA polymerázu a MgSO₄, do níž se přidá 5 µl extrahované DNA. Amplifikace probíhá izotermně při 63 °C po dobu 60 minut a výsledky lze detekovat vizuálně podle zákalu nebo elektroforézou na agarózovém gelu. Citlivost metody dosahuje 10² CFU/ml a její specifita byla potvrzena absencí křížové reakce s jinými bakteriemi. Ve srovnání s klasickou kultivací, která detekuje pouze omezený počet případů, metoda LAMP odhalí výrazně více infekcí díky vyšší citlivosti, a dokáže tak identifikovat i ty případy, které by kultivace přehlédla (Li et al., 2020).

3.3.3 *Haemophilus influenzae*

V současné diagnostice invazivních infekcí způsobených *Haemophilus influenzae* se stále častěji využívá multiplexní real-time PCR, která umožňuje rychlou a specifickou detekci přímo z klinických vzorků, jako jsou mozkomíšní mok, krev, sérum nebo plazma. Tato metoda umožňuje simultánní amplifikaci více cílových genů v jedné reakci, což zkracuje dobu analýzy a snižuje riziko kontaminace. Vedle multiplexní PCR se v praxi používají i klasické PCR metody nebo kvantitativní PCR (qPCR) zaměřené na jednotlivé patogeny, které však často vyžadují více času a vzorků.

Pro detekci *Haemophilus influenzae* byly využity klinické vzorky, například výtěry z krku, ze kterých byla izolována DNA pomocí standardní extrakční metody zahrnující použití DNazol. Po srážení a promytí DNA ethanolem byl vzorek resuspendován ve sterilní vodě a inkubován při 50 °C. PCR reakční směs o celkovém objemu 25 µl obsahovala univerzální PCR mix s Taq polymerázou, specifické primery a fluorescenčně značené sondy zaměřené na gen *bexA*, který je charakteristický pro *H. influenzae*, a další cílové geny.

K reakci bylo přidáno 2 µl extrahované DNA. Amplifikace probíhala v reálném čase pomocí termocykléru TaqMan, s počáteční denaturací při 95 °C po dobu 10 minut, následovanou 45 cykly, přičemž každý cyklus zahrnoval denaturaci při 95 °C po dobu 15 sekund a následnou annealingovou a prodlužovací fázi při 60 °C po dobu jedné minuty. Výsledky byly vyhodnocovány na základě průběžného měření fluorescence a prahové hodnoty Ct. Vzorky, u kterých během 45 cyklů nedošlo ke zvýšení fluorescence, byly považovány za negativní (Farajzadeh Sheikh et al., 2021).

3.3.4 *Mycoplasma pneumoniae*

Detekce *Mycoplasma pneumoniae* v současnosti využívá více diagnostických přístupů, mezi nimiž hrají důležitou roli jak klasické mikrobiologické metody, tak moderní molekulární techniky. Mezi používané metody patří kultivace, barvení, specifické protilátky (např. IgM testy) a multiplexní PCR, která umožňuje současnou detekci více respiračních patogenů. Významným pokrokem v diagnostice je metagenomické sekvenování nové generace (mNGS), které umožňuje identifikaci přítomných mikroorganismů v bronchoalveolární laváži (BALF) na základě DNA analýzy. Tento přístup poskytuje široké spektrum informací o patogenech i v případech, kdy klasické metody selhávají, a přispívá tak k přesnějšímu určení původce infekce (Zhao et al., 2025).

Pro detekci metodou mNGS byly využity klinické vzorky, především bronchoalveolární lavážní tekutina. Z těchto vzorků byla extrahována celková DNA pomocí komerčního kitu určeného k izolaci mikrobiální DNA, přičemž byl dodržen standardní protokol zahrnující lýzu buněk, čištění DNA a její eluci ve sterilní pufované vodě. Extrahovaná DNA byla následně náhodně fragmentována na segmenty o velikosti přibližně 200–300 bp, ze kterých byla připravena sekvenační knihovna prostřednictvím enzymatických reakcí, zahrnujících end repair, ligaci adaptérů a PCR amplifikaci. Krátké fragmenty DNA připravené tímto způsobem byly sekvenovány. Raw data prošla bioinformatickým zpracováním, při kterém byly odstraněny nízkokvalitní a lidské sekvence a zbývající úseky byly mapovány proti mikrobiálním databázím z NCBI. Tímto způsobem bylo možné identifikovat přítomné mikroorganismy porovnáním získaných sekvencí s referenčními databázemi (Cai et al., 2023).

3.3.5 Legionella pneumophila

Mezi hlavní molekulární metody používané k detekci *Legionella pneumophila* patří především polymerázová řetězová reakce (PCR), která umožňuje cílenou identifikaci druhu na základě přítomnosti specifických genů, jako je například gen *mip*. V moderní diagnostice se často využívá multiplexní PCR, která umožňuje detekci více patogenů současně v jednom vzorku. Pro ještě širší diagnostické možnosti byla vyvinuta metoda DNA microarray, jež kombinuje výhody multiplexní PCR s hybridizací na čipu obsahujícím sondy pro různé bakteriální druhy.

Pro detekci *L. pneumophila* byly využity vzorky z dýchacích cest pacientů s podezřením na pneumonii. Z těchto vzorků byla nejprve izolována DNA, která sloužila jako templát pro PCR reakci. Pomocí multiplexní PCR byly namnoženy jak obecné úseky bakteriální 16S rDNA, tak specifický gen *mip*. Produkty PCR byly následně naneseny na speciální microarray čip, který obsahoval sondy pro různé bakteriální druhy. Tyto sondy se váží na cílové sekvence, pokud jsou ve vzorku přítomny. Pokud se DNA naváže na správné sondy, je to detekováno pomocí fluorescence. Výsledky bylo možné vyhodnotit během několika hodin a metoda umožnila detekci velmi malého množství DNA (přibližně 10^3 kopií/ μ l). Tato metoda tak poskytuje rychlou a přesnou identifikaci přímo z klinických vzorků bez nutnosti kultivace (Ma et al., 2020).

3.4 Trendy a budoucí směry diagnostiky

V posledních letech nabývá na významu diagnostika onemocnění dýchacích cest přímo v místě péče o pacienta (tzv. POCT – point of care testing). Tento přístup umožňuje rychlé, citlivé a dostupné testování mimo laboratoře, což je zásadní pro včasnou izolaci nakažených a omezení šíření infekcí. Významný pokrok nastal zejména v oblasti mikrofluidních zařízení a papírových platforem, které se jeví jako nejperspektivnější pro další vývoj. Mezi hlavní používané technologie patří imunodiagnostika, molekulární testy včetně izotermické amplifikace, a nově i systémy založené na CRISPR. Budoucnost diagnostiky respiračních virů směřuje k vyšší dostupnosti, rychlosti, přesnosti a snadnému použití i v podmínkách s omezenými zdroji (Seok et al., 2023).

3.4.1 Nové technologie a přístupy

Jedním z hlavních směrů vývoje je využití tzv. point-of-care (POC) zařízení, která umožňují rychlou a přesnou detekci patogenů přímo v místě péče o pacienta. Mezi klíčové inovace patří mikrofluidní čipy schopné automatického zpracování vzorku, včetně extrakce nukleových kyselin a následné amplifikace cílové genetické informace. Tyto systémy často využívají metody izotermální amplifikace, jako je RT-LAMP, pro zajištění rychlé a spolehlivé detekce bez potřeby složité laboratorní infrastruktury. V kombinaci s pokročilými řídicími jednotkami, snímači a uživatelsky přívětivým rozhraním představují moderní diagnostické platformy efektivní nástroj pro boj s různými respiračními virovými onemocněními, zejména v prostředích s omezenými zdroji (Nguyen et al., 2024).

Izotermální amplifikace DNA, konkrétně metoda LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification), představuje moderní přístup pro detekci mikroorganismů, který vyniká svou rychlostí a citlivostí. Na rozdíl od klasické PCR, která vyžaduje cyklické změny teploty, probíhá LAMP reakce při konstantní teplotě (obvykle kolem 60–65 °C). Amplifikace je umožněna pomocí speciálně navržených primerů, které cílí na specifické úseky cílové DNA. Reakcí vznikají charakteristické produkty tvořené opakujícími se sekvencemi, jejichž přítomnost lze snadno indikovat – například barevnou změnou reakční směsi nebo fluorescencí. Právě tento jednoduchý vizuální výstup umožňuje aplikaci LAMP i mimo laboratorní prostředí.

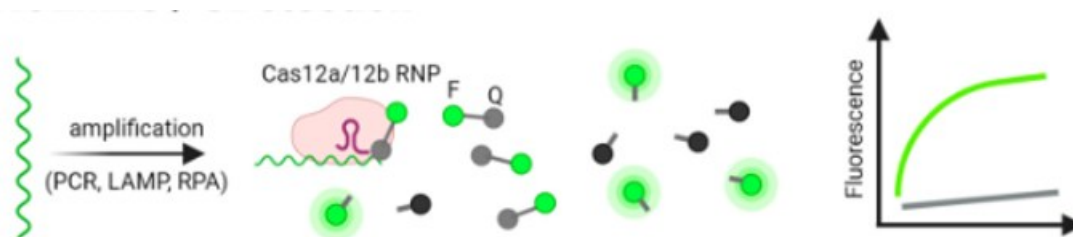
Velkou výhodou metody LAMP je její schopnost pracovat i s minimálním množstvím DNA bez nutnosti purifikace nukleových kyselin, což je zvláště důležité při analýze vzorků s nízkou biologickou zátěží, například respiračních vzorků. Díky vysoké specifitě dokáže LAMP cíleně detekovat genové sekvence charakteristické pro konkrétní patogeny. Tato vlastnost ji činí ideální volbou pro rychlou a přesnou identifikaci mikroorganismů v respiračních vzorcích. V kontextu detekce patogenů dýchacích cest tak LAMP představuje velmi praktický nástroj pro časnou diagnostiku a okamžité rozhodování v krizových situacích (Bani et al., 2024).

3.4.2 Molekulární inovace

V posledních letech došlo k významnému rozvoji molekulárních diagnostických metod, přičemž jednou z nejprogresivnějších a nejdiskutovanějších inovací je technologie CRISPR Cas. Díky schopnosti velmi přesně rozpoznávat a štěpit specifické sekvence DNA nebo RNA se tyto systémy rychle uplatnily v oblasti diagnostiky genetického materiálu. Využívají při tom tzv. Cas proteiny, které jsou řízeny průvodními RNA molekulami (guide RNA),

a zaměřují se na přesné rozpoznání cílových nukleových kyselin. CRISPR/Cas technologie se stávají základem pro různé biosenzory, které využívají fluorescenční, elektrochemické či barevné signály k snadnému a rychlému odhalení genetického materiálu, a to jak patogenního, tak i nepatogenního původu.

Jedním z hlavních principů, které se používají při diagnostice pomocí CRISPR/Cas, je tzv. trans-štěpení, což je typické pro protein Cas12. Jakmile se Cas12 naváže na specifickou cílovou DNA a provede štěpení cílové sekvence (cis štěpení), aktivuje se jeho nespecifická enzymová funkce, která ale nesměřuje jen na jeden konkrétní úsek, ale začne štěpit i okolní jednovláknovou DNA (nespecifické štěpení). Tento proces se nazývá trans štěpení a funguje jako zesilovač signálu v detekčních testech. V praxi to znamená, že pokud je přítomná cílová sekvence, Cas12 začne štěpit i speciální sondy označené fluoroforem a quencherem, přičemž jejich štěpením se fluorofor uvolní od quencheru a vznikne měřitelný fluorescenční signál. Díky tomu jsou tyto testy mnohem citlivější a rychlejší (Son, 2024).



Obrázek 9: Princip detekce pomocí CRISPR/Cas12 a fluorescenčního signálu

Po amplifikaci cílové DNA (např. metodou PCR, LAMP nebo RPA) se na specifickou sekvenci naváže komplex Cas12a/crRNA. Aktivovaný protein Cas12a spustí trans-štěpení – štěpí nejen cílovou DNA, ale i přítomné fluorescenčně značené sondy, které jsou označeny fluoroforem (F) a quencherem (Q). Po jejich rozštěpení dochází k uvolnění fluoroforu a tím ke vzniku měřitelného fluorescenčního signálu. Intenzita fluorescence odráží množství cílové DNA ve vzorku (Son, 2024).

3.4.3 Role umělé inteligence

Diagnostika infekčních onemocnění, včetně respiračních, je stále častěji podporována využitím umělé inteligence (AI). AI technologie výrazně usnadňuje analýzu dat z vysokokapacitního sekvenování (NGS), což umožňuje rychlou a přesnou identifikaci patogenů přímo ze vzorků bez potřeby předchozího cílení na specifické mikroorganismy. Platformy jako IDseq, které využívají metagenomickou analýzu, dokáží efektivně odhalit přítomnost bakterií, virů, hub i parazitů. Umělá inteligence rovněž umožňuje detekci

rezistence vůči antibiotikům a analýzu virulence na základě genomových dat, čímž podporuje cílenou léčbu a zvyšuje šanci na včasný terapeutický zásah. Kromě toho se AI využívá i při klasifikaci patogenů na základě jejich genetických sekvencí, modelování evolučních trendů a predikci přenosových cest, což je zásadní pro epidemiologické sledování respiračních patogenů. Díky tomu nastává zefektivnění diagnostiky, zkrácení doby detekce a snížení nákladů v klinické praxi. I přes svůj potenciál však AI není zcela bezchybná – její výstupy mohou být ovlivněny kvalitou vstupních dat či použitým algoritmem a v některých případech vykazuje nestabilní nebo méně konzistentní výsledky. Přesto je její vývoj mimořádně dynamický a do budoucna se očekává, že bude stále častěji začleňována do rutinní diagnostiky (Gao a Liu, 2024).

4 ZÁVĚR

Správná a rychlá diagnostika patogenů dýchacích cest je klíčová pro úspěšnou léčbu, snížení komplikací i omezení šíření infekce. Vzhledem k tomu, že onemocnění dýchacích cest patří mezi nejčastější infekční choroby, má kvalitní laboratorní diagnostika zásadní význam jak pro jednotlivé pacienty, tak pro celý zdravotnický systém.

V této práci byly popsány vybrané významné bakteriální patogeny dýchacích cest, jejich patogenezé, klinické projevy i epidemiologie. Tyto informace jsou důležité nejen z klinického, ale i z diagnostického hlediska, protože různé patogeny vyžadují rozdílný přístup k detekci.

V současné době se v laboratorní praxi nejčastěji uplatňují molekulární metody, zejména PCR a real-time PCR, které poskytují výsledky s vysokou citlivostí, specificitou a ve velmi krátkém čase. Oproti tradičním metodám, jako je kultivace nebo mikroskopie, umožňují detekci i tehdy, když je přítomnost patogenu minimální nebo je nelze kultivovat. To je klíčové zejména při akutních stavech, kdy je rychlá diagnostika rozhodující pro volbu terapie.

Diagnostické metody se neustále vyvíjejí. Nové přístupy jako technologie CRISPR-Cas nebo využití umělé inteligence přinášejí možnosti dalšího zrychlení a zjednodušení celého procesu. Velký důraz je také kladen na multiplexní testy, které dokážou z jednoho vzorku detekovat více původců najednou, což je výhodné zejména v sezóně respiračních infekcí.

Diagnostika infekčních onemocnění má přímý vliv na kvalitu zdravotní péče. Podle odhadů může včasná a správně zvolená diagnostická metoda zachránit miliony životů ročně. Její další rozvoj tak představuje důležitý krok nejen v klinické medicíně, ale i ve zlepšování veřejného zdraví.

Tato práce ukazuje, jak důležité je propojení vědeckého pokroku s praktickým využitím v medicíně. Moderní diagnostika zůstává klíčem k rychlé a přesné detekci infekcí a tím i k účinnější péči o pacienty.

POUŽITÁ LITERATURA

- ADAMS, Grace. A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. Online. *The Biochemist*. 2020, roč. 42, č. 3, s. 48-53. ISSN 0954-982X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1042/BIO20200034>. [cit. 2025-05-01].
- ALONSODEVELASCO, E; VERHEUL, A F; VERHOEF, J a SNIPPE, H. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Online. *Microbiological Reviews*. 1995, roč. 59, č. 4, s. 591-603. ISSN 0146-0749. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/mr.59.4.591-603.1995>. [cit. 2025-03-15].
- ANUAR, Nurul Fathiyah Zaipul; DESA, Mohd Nasir Mohd; HUSSAINI, Jamal; WONG, Eng Hwa; MARIAPPAN, Vanitha; VELLASAMY, Kumutha Malar; PALANISAMY, Navindra Kumari. Role of cell surface proteins and toll-like receptors in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*. Online. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2024, roč. 27, č. 2, s. 214-222. ISSN 2008-3866. Dostupné z: <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2023.72584.15791>. [cit. 2025-03-22].
- AYESHA, Ayesha; CHOW, Franklin Wang-Ngai a LEUNG, Polly Hang-Mei. Role of *Legionella pneumophila* outer membrane vesicles in host-pathogen interaction. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2023, roč. 14. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1270123>. [cit. 2025-04-01].
- BANI, Alessia; WHITBY, Corinne; COLBECK, Ian; DUMBRELL, Alex J. a FERGUSON, Robert M. W. Rapid In-Field Detection of Airborne Pathogens Using Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). Online. *Microorganisms*. 2024, roč. 12, č. 12. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12122578>. [cit. 2025-05-26].
- BURNS, Drusilla L. Secretion of Pertussis Toxin from *Bordetella pertussis*. Online. *Toxins*. 2021, roč. 13, č. 8. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/toxins13080574>. [cit. 2025-03-22].
- BUSTIN, Stephen A. Improving the quality of quantitative polymerase chain reaction experiments: 15 years of MIQE. Online. *Molecular Aspects of Medicine*. 2024, roč. 96. ISSN 00982997. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2024.101249>. [cit. 2025-05-01].
- CAI, Yuanqing; DING, Haiqi; CHEN, Xiaoqing; CHEN, Yang; HUANG, Changyu et al. Optimization and standardization of mNGS-based procedures for the diagnosis of *Mycoplasma periprosthetic joint infection*: A novel diagnostic strategy for rare bacterial

- periprosthetic joint infection. Online. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2023, roč. 13. ISSN 2235-2988. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1089919>. [cit. 2025-05-30].
- COLE, Matthew; SIMON, Ashley K.; FAULKNER, Amanda; SKOFF, Tami; TONDELLA, Maria L. et al. Comparison of *Bordetella* species identification among differing rt-PCR assays in the United States. Online. *Microbiology Spectrum*. 2024, roč. 12, č. 8, s. e00783-24. ISSN 2165-0497. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/spectrum.00783-24>. [cit. 2025-05-21]
- DEBBIA, E.A.; SCHITO, G.C.; ZORATTI, A.; GUALCO, L.; TONOLI, E. et al. Epidemiology of Major Respiratory Pathogens. Online. *Journal of Chemotherapy*. 2013, roč. 13, č. sup4, s. 205-210. ISSN 1120-009X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1179/joc.2001.13.Supplement-2.205>. [cit. 2025-03-11].
- DING, Rui; ZHANG, Yan; XU, Xiangzhu; HOU, Yunfeng; NIE, Jing et al. Inhibitory effect of hederagenin on *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin in vitro. Online. *Microbes and Infection*. 2022, roč. 24, č. 2. ISSN 12864579. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2021.104888>. [cit. 2025-03-22].
- DU, Qian-qian; SHI, Wei; YU, Dan a YAO, Kai-hu. Epidemiology of non-vaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* before and after universal administration of pneumococcal conjugate vaccines. Online. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2021, roč. 17, č. 12, s. 5628-5637. ISSN 2164-5515. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1985353>. [cit. 2025-03-23].
- EHTISHAM, Mohammad; WANI, Firdous; WANI, Iram; KAUR, Prabhjot a NISSAR, Sheeba. Polymerase Chain Reaction (PCR): Back to Basics. Online. *Indian Journal of Contemporary Dentistry*. 2016, roč. 4, č. 2. ISSN 2320-5806. Dostupné z: <https://doi.org/10.5958/2320-5962.2016.00030.9>. [cit. 2025-05-01].
- FARAJZADEH SHEIKH, Ahmad; RAHIMI, Robab; MEGHDADI, Hossein; ALAMI, Ameneh a SAKI, Morteza. Multiplex polymerase chain reaction detection of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* and their antibiotic resistance in patients with community-acquired pneumonia from southwest Iran. Online. *BMC Microbiology*. 2021, roč. 21, č. 1. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02408-7>. [cit. 2025-05-21].
- FREIBERGER, Tomáš. PCR diagnosis of infectious diseases. Online. *Vnitřní lékařství*. 2017, roč. 63, č. 7-8, s. 472-474. ISSN 0042773X. Dostupné z: <https://doi.org/10.36290/vnl.2017.098>. [cit. 2025-04-13].

- GAO, Yunqiu a LIU, Min. Application of machine learning based genome sequence analysis in pathogen identification. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2024, roč. 15. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1474078>. [cit. 2025-04-20].
- GOLSHANI, Maryam; RAHMAN, Waheed Ur; OSICKOVA, Adriana; HOLUBOVA, Jana; LORA, Jinery et al. Filamentous Hemagglutinin of *Bordetella pertussis* Does Not Interact with the β 2 Integrin CD11b/CD18. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, roč. 23, č. 20. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms232012598>. [cit. 2025-03-22].
- GU, Wei; MILLER, Steve a CHIU, Charles Y. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. Online. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2019, roč. 14, č. 1, s. 319-338. ISSN 1553-4006. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751>. [cit. 2025-05-12].
- GUPTA, Annapurna; SALEENA, Lilly M.; KANNAN, Priya a SHIVACHANDRAN, A. The impact of oral diseases on respiratory health and the influence of respiratory infections on the oral microbiome. Online. *Journal of Dentistry*. 2024, roč. 148. ISSN 03005712. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2024.105213>. [cit. 2025-03-22].
- HARRISON, Alistair; MASON, Kevin M. Pathogenesis of *Haemophilus influenzae* in Humans. Online. *Human Emerging and Re-emerging Infections: Viral and Parasitic Infections, Volume I*. 2015, ch. 27. ISSN 9781118644843. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781118644843.ch27>. [cit. 2025-03-23].
- HEININGER, Ulrich; MARTINI, Helena; EEUWIJK, Jennifer; PROKIĆ, Ivana; GUIGNARD, Adrienne P. et al. Pertactin deficiency of *Bordetella pertussis*: Insights into epidemiology, and perspectives on surveillance and public health impact. Online. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2024, roč. 20, č. 1. ISSN 2164-5515. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21645515.2024.2435134>. [cit. 2025-03-22].
- HU, Taishan; CHITNIS, Nilesh; MONOS, Dimitri a DINH, Anh. Next-generation sequencing technologies: An overview. Online. *Human Immunology*. 2021, roč. 82, č. 11, s. 801-811. ISSN 01988859. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>. [cit. 2025-05-12].
- HU, Ya-Li; LEE, Ping-Ing; HSUEH, Po-Ren; LU, Chun-Yi; CHANG, Luan-Yin et al. Predominant role of *Haemophilus influenzae* in the association of conjunctivitis, acute otitis media and acute bacterial paranasal sinusitis in children. Online. *Scientific Reports*. 2021, roč. 11, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79680-6>. [cit. 2025-03-25].

- HUBER, D.; VOITH VON VOITHENBERG, L. a KAIGALA, G.V. Fluorescence in situ hybridization (FISH): History, limitations and what to expect from micro-scale FISH? Online. *Micro and Nano Engineering*. 2018, roč. 1, s. 15-24. ISSN 25900072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mne.2018.10.006>. [cit. 2025-05-11].
- HUH, Y J a WEISS, A A. A 23-kilodalton protein, distinct from BvgA, expressed by virulent *Bordetella pertussis* binds to the promoter region of vir-regulated toxin genes. Online. *Infection and Immunity*. 1991, roč. 59, č. 7, s. 2389-2395. ISSN 0019-9567. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/iai.59.7.2389-2395.1991>. [cit. 2024-11-23].
- CHATZIPARASIDIS, Grigorios; KANTAR, Ahmad a GRIMWOOD, Keith. Pathogenesis of nontypeable *Haemophilus influenzae* infections in chronic suppurative lung disease. Online. *Pediatric Pulmonology*. 2023, roč. 58, č. 7, s. 1849-1860. ISSN 8755-6863. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ppul.26446>. [cit. 2025-03-23].
- CHAUDHRY, R; GHOSH, A a CHANDOLIA, A. Pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae*: An update. Online. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2016, roč. 34, č. 1, s. 7-16. ISSN 02550857. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0255-0857.174112>. [cit. 2025-03-27].
- CHEN, Wei; ZHANG, Xuepeng; ZHAO, Wenwu; YANG, Lan; WANG, Zhe et al. Environmental factors and spatiotemporal distribution characteristics of the global outbreaks of the highly pathogenic avian influenza H5N1. Online. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022, roč. 29, č. 29, s. 44175-44185. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19016-1>. [cit. 2025-03-26].
- ILIADI, Valeria; STAYKOVA, Jeni; ILIADIS, Sergios; KONSTANTINIDOU, Ina; SIVYKH, Polina et al. *Legionella pneumophila*: The Journey from the Environment to the Blood. Online. *Journal of Clinical Medicine*. 2022, roč. 11, č. 20. ISSN 2077-0383. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jcm11206126>. [cit. 2025-04-03].
- JIANG, Zhulin; LI, Shuihong; ZHU, Cuiming; ZHOU, Runjie a LEUNG, Polly H. M. *Mycoplasma pneumoniae* Infections: Pathogenesis and Vaccine Development. Online. *Pathogens*. 2021, roč. 10, č. 2. ISSN 2076-0817. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pathogens10020119>. [cit. 2025-03-27].
- KADRI, Karim. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. Online. In: L. NAGPAL, Madan; BOLDURA, Oana-Maria; BALŤĂ, Cornel a ENANY, Shymaa (ed.). *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. IntechOpen, 2020. ISBN 978-1-78984-089-6. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>. [cit. 2025-04-24].

- KARUNANATHIE, Harsheni; KEE, Ping Siu; NG, Shioh Fern; KENNEDY, Martin A. a CHUA, Eng Wee. PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR. Online. *Biochimie*. 2022, roč. 197, s. 130-143. ISSN 03009084. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.02.009>. [cit. 2025-04-24].
- KERR, J. R. a MATTHEWS, R. C. Bordetella pertussis Infection: Pathogenesis, Diagnosis, Management, and the Role of Protective Immunity. Online. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2000, roč. 19, č. 2, s. 77-88. ISSN 0934-9723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s100960050435>. [cit. 2025-02-25].
- KHAN, Hina Rmsha Alfia; SINGH, Avtar; USMAN, Omer; RAFIQ, Samir a AMIN, Anam. Acute Pancreatitis: An Unusual Extrapulmonary Manifestation of Mycoplasma pneumoniae. Online. *Cureus*. ISSN 2168-8184. Dostupné z: <https://doi.org/10.7759/cureus.25052>. [cit. 2025-03-30].
- KLIBANOV, Olga M.; KEHR, Heather; JETER, Zanesha a EKWONU, Tabugbo. Fatal Meningitis and Sepsis Caused by Nontypeable Haemophilus influenzae. Online. *Journal of Medical Cases*. 2022, roč. 13, č. 8, s. 396-401. ISSN 1923-4155. Dostupné z: <https://doi.org/10.14740/jmc3974>. [cit. 2025-03-23].
- KONG, Xiaohan; JIA, Yizhen; WANG, Han; LI, Rui; LI, Chujie et al. Effective Treatment of Haemophilus influenzae -Induced Bacterial Conjunctivitis by a Bioadhesive Nanoparticle Reticulate Structure. Online. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2023, roč. 15, č. 19, s. 22892-22902. ISSN 1944-8244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsami.3c01308>. [cit. 2025-03-25].
- KOWALCZYK, Bożena; MAŁEK, Agata a PALUSIŃSKA-SZYSZ, Marta. Budowa IV systemu sekrecji Legionella pneumophila i jego znaczenie w patogenezie. Online. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2021, roč. 75, č. 1, s. 548-562. ISSN 1732-2693. Dostupné z: <https://doi.org/10.2478/ahem-2021-0023>. [cit. 2025-04-03].
- LEE, Eon-Bee a LEE, Kyubae. Coptis rhizome extract influence on Streptococcus pneumoniae through autolysin activation. Online. *AMB Express*. 2024, roč. 14, č. 1. ISSN 2191-0855. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13568-024-01736-x>. [cit. 2025-03-22].
- LI, Chi; HUANG, Chaoying; ZHANG, Ruimu; WANG, Hongmei; TIAN, Shufeng et al. Evaluation of BioFire Respiratory Panel 2 plus for Detection of Bordetella pertussis in Nasopharyngeal Swab Specimens from Children with Clinically Suspected Pertussis. Online. *Microbiology Spectrum*. 2023, roč. 11, č. 1, s. e01806-22. ISSN 2165-0497.

- Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/spectrum.01806-22>. [cit. 2025-05-21].
- LI, Y.; MA, Linlin; DUAN, Siqi; LI, M. a CHEN, J. Development of a Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Clinical Sputum Samples. Online. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020, roč. 20, č. s2. Dostupné z: <https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.spl.13>. [cit. 2025-05-21].
- LIN, Wei-Hsuan; CHIU, Han-Cheng; CHEN, Kuan-Fu; TSAO, Kuo-Chien; CHEN, Yi-Yin et al. Molecular detection of respiratory pathogens in community-acquired pneumonia involving adults. Online. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2022, roč. 55, č. 5, s. 829-837. ISSN 16841182. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2021.11.009>. [cit. 2025-05-13].
- MA, Xiuqing; LI, Yanqin; LIANG, Yuan; LIU, Yang; YU, Ling et al. Development of a DNA microarray assay for rapid detection of fifteen bacterial pathogens in pneumonia. Online. *BMC Microbiology*. 2020, roč. 20, č. 1. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01842-3>. [cit. 2025-05-30].
- MAHMOUD, Dr. Barakat S M (ed.). *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*. Online. InTech, 2012. ISBN 978-953-307-782-6. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/1308>. [cit. 2025-05-11].
- MAŁEK, Agata; KOWALCZYK, Bożena a PALUSIŃSKA-SZYSZ, Marta. Budowa i znaczenie II systemu sekrecji białek w ekologii i patogenezie *Legionella pneumophila*. Online. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2021, roč. 75, č. 1, s. 584-598. ISSN 1732-2693. Dostupné z: <https://doi.org/10.2478/ahem-2021-0034>. [cit. 2025-04-03].
- MANCUSO, Giuseppe; MIDIRI, Angelina; GERACE, Elisabetta a BIONDO, Carmelo. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. Online. *Pathogens*. 2021, roč. 10, č. 10. ISSN 2076-0817. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>. [cit. 2025-03-22].
- MELVIN, Jeffrey A.; SCHELLER, Erich V.; MILLER, Jeff F. a COTTER, Peggy A. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. Online. *Nature Reviews Microbiology*. 2014, roč. 12, č. 4, s. 274-288. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3235>. [cit. 2024-11-23].
- MEYER SAUTEUR, Patrick M; BEETON, Michael L; ULDUM, Søren A; BOSSUYT, Nathalie; VERMEULEN, Melissa et al. *Mycoplasma pneumoniae* detections before and during the COVID-19 pandemic: results of a global survey, 2017 to 2021.

- Online. *Eurosurveillance*. 2022, roč. 27, č. 19. ISSN 1560-7917. Dostupné z: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.19.2100746>. [cit. 2025-03-30].
- MONISTERO, Valentina; VICARI, Nadia; PRATI, Paola; BRAGONI, Roldano; GAZZOLA, Alessandra et al. A rapid and reliable method for early *Legionella pneumophila* identification and characterization in support of the epidemiology study. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2024, roč. 15. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1452861>. [cit. 2025-04-03].
- MONTGOMERY, Matthew T.; ORTIGOZA, Mila; LOOMIS, Cynthia; WEISER, Jeffrey N. a HILLER, N. Luisa. Neuraminidase-mediated enhancement of *Streptococcus pneumoniae* colonization is associated with altered mucus characteristics and distribution. Online. *MBio*. 2025, roč. 16, č. 1, s. e02579-24. ISSN 2150-7511. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/mbio.02579-24>. [cit. 2025-03-22].
- MUGHAL, Amjad Ali. Diagnosis of pertussis in vaccinated children of Khairpur, Sindh, Pakistan by Cough Plate Method. Online. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*. 2011, roč. 01, č. 02, s. 68-72. ISSN 21463158. Dostupné z: <https://doi.org/10.5799/ahinjs.02.2011.02.0016>. [cit. 2025-04-04].
- NGUYEN, Huynh Quoc; NGUYEN, Van Dan; PHAN, Vu Minh a SEO, Tae Seok. Development of a self-contained microfluidic chip and an internet-of-things-based point-of-care device for automated identification of respiratory viruses. Online. *Lab on a Chip*. 2024, roč. 24, č. 9, s. 2485-2496. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D3LC00933E>. [cit. 2025-05-26].
- NIEVES, Delma J. a HEININGER, Ulrich. Bordetella pertussis. Online. In: SCHELD, W. Michael; HUGHES, James M. a WHITLEY, Richard J. (ed.). *Emerging Infections* 10. Washington, DC, USA: ASM Press, 2016, s. 311-339. ISBN 9781683670728. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/9781555819453.ch17>. [cit. 2024-11-22].
- NIKOLKA, Fabian; KARAGÖZ, Mustafa Safa; NASSEF, Mohamed Zakaria; HILLER, Karsten; STEINERT, Michael et al. The Virulence Factor Macrophage Infectivity Potentiator (Mip) Influences Branched-Chain Amino Acid Metabolism and Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. Online. *Metabolites*. 2023, roč. 13, č. 7. ISSN 2218-1989. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/metabo13070834>. [cit. 2025-04-03].
- OCAK, Melike; ÖZ, Fatma Nur; ÇINAR, Hasibe Gökçe a TANIR, Gönül. Clinical and radiologic manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children. Online. *The Turkish Journal of Pediatrics*. 2022, roč. 64, č. 6, s. 1031-1040. ISSN 2791-6421. Dostupné z: <https://doi.org/10.24953/turkjped.2022.545>. [cit. 2025-03-30].

- OKTARI, A; VANAWATI, N a KURNIAWATI, U I. The optimization of Human Blood Agar (HBA) for *Streptococcus pneumoniae* growth. Online. Journal of Physics: Conference Series. 2019, roč. 1280, č. 2. ISSN 1742-6588. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1280/2/022002>. [cit. 2025-04-03].
- OLIVER, Sara E; RUBIS, Amy B; SOETERS, Heidi M; REINGOLD, Arthur; BARNES, Meghan et al. Epidemiology of Invasive Nontypeable *Haemophilus influenzae* Disease — United States, 2008–2019. Online. Clinical Infectious Diseases. 2023, roč. 76, č. 11, s. 1889-1895. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/cid/ciad054>. [cit. 2025-03-26].
- ÖRTQVIST, Åke; HEDLUND, Jonas a KALIN, Mats. *Streptococcus pneumoniae*: Epidemiology, Risk Factors, and Clinical Features. Online. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. 2005, roč. 26, č. 06, s. 563-574. ISSN 1069-3424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1055/s-2005-925523>. [cit. 2025-03-15].
- PETTIGREW, Melinda. Molecular epidemiology of *Streptococcus Pneumoniae* mediated otitis media. Online. Frontiers in Bioscience. 2003, roč. 8, č. 5, s. e87-93. ISSN 10939946. Dostupné z: <https://doi.org/10.2741/961>. [cit. 2025-03-15].
- ROLANDO, Justin C.; MELKONIAN, Arek V. a WALT, David R. The Present and Future Landscapes of Molecular Diagnostics. Online. Annual Review of Analytical Chemistry. 2024, roč. 17, č. 1, s. 459-474. ISSN 1936-1327. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061622-015112>. [cit. 2025-04-14].
- SARAYA, Takeshi. The History of *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia. Online. Frontiers in Microbiology. 2016, roč. 7. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00364>. [cit. 2025-04-03].
- SATAM, Heena; JOSHI, Kandarp; MANGROLIA, Upasana; WAGHOO, Sanober; ZAIDI, Gulnaz et al. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. Online. Biology. 2023, roč. 12, č. 7. ISSN 2079-7737. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biology12070997>. [cit. 2025-05-12].
- SEALEY, Katie L.; BELCHER, Thomas a PRESTON, Andrew. Bordetella pertussis epidemiology and evolution in the light of pertussis resurgence. Online. Infection, Genetics and Evolution. 2016, roč. 40, s. 136-143. ISSN 15671348. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.032>. [cit. 2025-06-03].
- SEOK, Youngung; MAUK, Michael G.; LI, Ruijie a QIAN, Cheng. Trends of respiratory virus detection in point-of-care testing: A review. Online. Analytica Chimica Acta. 2023, roč. 1264. ISSN 00032670. Dostupné

- z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341283>. [cit. 2025-05-18].
- SHARMA, Sawati; GOYAL, Shubham; KAUR, Narinder Pal; VATS, Akhilesh. Meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*: A review. Online. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2014, roč. 5, č. 7, s. 2584-2595. ISSN 0975-8232. Dostupné z: [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5\(7\).2584-95](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(7).2584-95). [cit. 2025-03-15].
- SHENOY, Padmaja Ananth. Microbiological Characterization of *Haemophilus influenzae* Isolated from Patients with Lower Respiratory Tract Infections in a Tertiary Care Hospital, South India. Online. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. 2016. ISSN 2249782X. Dostupné z: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/18612.7892>. [cit. 2025-04-03].
- SON, Heyjin. Harnessing CRISPR/Cas Systems for DNA and RNA Detection: Principles, Techniques, and Challenges. Online. *Biosensors*. 2024, roč. 14, č. 10. ISSN 2079-6374. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bios14100460>. [cit. 2025-05-20].
- SOUMANA, Illiassou H.; DEWAN, Kalyan K.; LINZ, Bodo; RIVERA, Israel; MA, Longhuan et al. Modeling the catarrhal stage of *Bordetella pertussis* upper respiratory tract infections in mice. Online. *Disease Models & Mechanisms*. 2022, roč. 15, č. 5. ISSN 1754-8403. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/dmm.049266>. [cit. 2025-03-22].
- SUBBARAM, Kannan; KANNAN, Hemalatha a MASADEH, Majed Mohammad Ahmad. Isolation, identification, characterization and antibiotic sensitivity profile of pathogenic *Legionella pneumophila* isolates from different water sources. Online. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2017, roč. 7, č. 5, s. 411-415. ISSN 22211691. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.12.023>. [cit. 2025-04-02].
- TSAI, Ti-An; TSAI, Chang-Ku; KUO, Kuang-Che a YU, Hong-Ren. Rational stepwise approach for *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. Online. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2021, roč. 54, č. 4, s. 557-565. ISSN 16841182. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.10.002>. [cit. 2025-03-27].
- TURAN OZDEN, Hale a UCAR, Keziban. Comparison of community-acquired and nosocomial legionella pneumonia cases in Konya, Turkey. Online. *Annals of Clinical and Analytical Medicine*. 2024, roč. 15, č. 12. ISSN 2667663X. Dostupné z: <https://doi.org/10.4328/ACAM.22058>. [cit. 2025-04-04].
- VÁRADI, Linda; LUO, Jia Lin; HIBBS, David E.; PERRY, John D.; ANDERSON, Rosaleen J. et al. Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future. Online. *Chemical Society Reviews*. 2017, roč. 46, č. 16, s. 4818-

4832. ISSN 0306-0012. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C6CS00693K>. [cit. 2025-06-03].
- VIZARRAGA, David; TORRES-PUIG, Sergi; APARICIO, David a PICH, Oscar Q. The Sialoglycan Binding Adhesins of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. Online. Trends in Microbiology. 2021, roč. 29, č. 6, s. 477-481. ISSN 0966842X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.011>. [cit. 2025-03-27].
- WAN, Minzhong; ZHANG, Guobin a YI, Hang. Unraveling the resurgence of pertussis: Insights into epidemiology and global health strategies. Online. Pulmonology. 2024, roč. 30, č. 6, s. 503-505. ISSN 2531-0429. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2024.04.009>. [cit. 2025-03-23].
- WEN, Shuxian; FENG, Donghua; CHEN, Dingqiang; YANG, Ling a XU, Zhenbo. Molecular epidemiology and evolution of *Haemophilus influenzae*. Online. Infection, Genetics and Evolution. 2020, roč. 80. ISSN 15671348. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104205>. [cit. 2025-03-23].
- WONG, Kingsley L. a LIU, Juewen. Factors and methods to modulate DNA hybridization kinetics. Online. Biotechnology Journal. 2021, roč. 16, č. 11. ISSN 1860-6768. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/biot.202000338>. [cit. 2025-05-11].
- XU, Meng; LI, Ying; SHI, Yue; LIU, Haizhou; TONG, Xi et al. Molecular epidemiology of *Mycoplasma pneumoniae pneumonia* in children, Wuhan, 2020–2022. Online. BMC Microbiology. 2024, roč. 24, č. 1. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03180-0>. [cit. 2025-03-30].
- YAGIHASHI, Kunihiro; KURIHARA, Yasuyuki; FUJIKAWA, Atsuko; MATSUOKA, Shin a NAKAJIMA, Yasuo. Correlations between computed tomography findings and clinical manifestations of *Streptococcus pneumoniae pneumonia*. Online. Japanese Journal of Radiology. 2011, roč. 29, č. 6, s. 423-428. ISSN 1867-1071. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11604-011-0574-x>. [cit. 2025-03-15].
- YANG, Jin-Lei; LI, Danyang a ZHAN, Xiao-Yong. Concept about the Virulence Factor of *Legionella*. Online. Microorganisms. 2023, roč. 11, č. 1. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010074>. [cit. 2025-04-03].
- ZHAO, Meixi; SHI, Yanyan; ZHANG, Congcong; LU, Meiqin; SHEN, Meili et al. Diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing using bronchoalveolar lavage fluid samples for pathogen detection in children with severe or refractory pneumonia. Online. Microbiology Spectrum. 2025, roč. 13, č. 3, s. e01087-24. ISSN 2165-0497. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/spectrum.01087-24>. [cit. 2025-05-30].

ZHOU, Yuhong; WANG, Yu; CHENG, Jinzhi; ZHAO, Xue; LIANG, Yuedong et al.
Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Haemophilus influenzae* in
Guiyang, Guizhou, China. Online. *Frontiers in Public Health*. 2022, roč. 10. ISSN 2296-
2565. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.947051>. [cit. 2025-03-26].