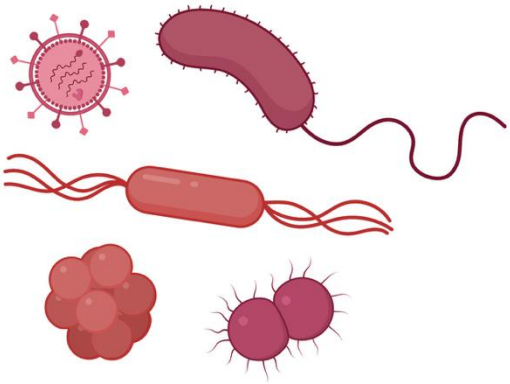
UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
JESSENIOVA LEKÁRSKA FAKULTA V MARTINE

Diagnostika infekčných ochorení a antimikrobiálna rezistencia

Matúš Dohál, Juraj Mokrý



Martin, 2026

Diagnostika infekčných ochorení a antimikrobiálna rezistencia
Vysokoškolské skriptá

Autorský kolektív:
Mgr. Matúš Dohál, PhD. Martinské centrum pre biomedicínu, JLF UK v Martine
prof. MUDr. Juraj Mokrý, PhD. Ústav farmakológie, JLF UK v Martine

Recenzenti:
prof. MUDr. Elena Nováková, PhD. Ústav mikrobiológie a imunológie, JLF UK v Martine
RNDr. Igor Porvazník, PhD. Katedra laboratórnych vyšetrovacích metód v zdravotníctve, FZ KU v Ružomberku

Vydanie: prvé
Počet strán: 84
Text neprešiel jazykovou korektúrou, za odbornú a jazykovú stránku zodpovedajú autori
Zverejnené na http://portal.jfmed.uniba.sk
ISBN 978-80-8187-182-5 EAN 9788081871825

Podporené grantmi VEGA: 1/0036/26; 1/0049/25; APVV: 18-0084; 22-0342.

Táto publikácia vznikla vďaka podpore projektu: „*Simulačné centrum Jesseniovej lekárskej fakulty UK v Martine*“, kód projektu: 401101B754. Tento projekt je spolufinancovaný Európskou úniou v rámci Programu Slovensko.

Ilustrácie vytvoril M. Dohál použitím softvéru BioRender (www.biorender.com).

Obsah

PREDHOVOR **5**

1. KLASIFIKÁCIA INFEKČNÝCH OCHORENÍ **6**

1.1. PODĽA PÔVODCU 6
1.1.1. Bakteriálne infekcie *6*
1.1.2. Hubové ochorenia (mykózy) *8*
1.1.3. Vírusové infekcie *11*
1.2. PODĽA MIESTA INFEKCIE 13

2. REZISTENCIA **16**

2.1. PRIRODZENÁ REZISTENCIA 16
2.2. ZÍSKANÁ REZISTENCIA 17
2.3. MECHANIZMY ANTIMIKROBIÁLNEJ REZISTENCIE 19

3. TRADIČNÉ MIKROBIOLOGICKÉ METÓDY **28**

3.1. MIKROSKOPIA 28
3.2. KULTIVÁCIA 30
3.3. BIOCHEMICKÉ TESTY 31

4. MOLEKULÁRNE DIAGNOSTICKÉ METÓDY **37**

4.1. POLYMERÁZOVÁ REŤAZOVÁ REAKCIA A JEJ MODIFIKÁCIE 37
4.1.1. Kvantitatívna PCR *39*
4.1.2. Multiplexová PCR *39*
4.1.3. Digitálna dropletová PCR *40*
4.2. IZOTERMÁLNE AMPLIFIKAČNÉ METÓDY 41
4.2.1. Loop-mediated isothermal amplification *42*
4.2.2. Amplifikácia závislá od helikázy *43*
4.3. SEKVENOVANIE A GENOMICKÉ PRÍSTUPY 43
4.3.1. Sangerovo sekvenovanie *44*
4.3.2. Sekvenovanie novej generácie *44*
4.4. VYUŽITIE MOLEKULÁRNYCH METÓD V POCT 50

5. IMUNOLOGICKÉ METÓDY **55**

5.1. AGLUTINAČNÉ TESTY 55
5.2. IMUNOFLUORESCENCIA 57
5.3. ENZYME-LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY 59
5.4. ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT SPOT 61
5.5. MULTIPLEXOVÉ METÓDY 62
5.6. IMUNOCHROMATOGRAFICKÉ TESTY 63
5.7. WESTERN BLOT 64
5.8. PERSPEKTÍVNE IMUNOLOGICKÉ METÓDY 65
5.8.1. Digitálna ELISA *65*
5.8.2. Imunosenzory *66*
5.8.3. Lab-on-a-Chip *66*

6. ANALYTICKÉ METÓDY **70**

6.1. MALDI-TOF MS 70
6.2. KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA S HMOTNOSTNOU SPEKTROMETRIOU 72
6.3. PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIA 73
6.4. VIBRAČNÁ SPEKTROSKOPIA 74

7. VYUŽITIE UMELEJ INTELIGENCIE V DIAGNOSTIKE INFEKČNÝCH OCHORENÍ A PERSONALIZOVANEJ MEDICÍNE 78

7.1. DIGITÁLNA MIKROSKOPIA A ANALÝZA MIKROSKOPICKÝCH PREPARÁTOV 78
7.2. ZOBRAZOVACIE METÓDY 79
7.3. MALDI-TOF MS 79
7.4. MOLEKULÁRNO-GENETICKÉ METÓDY 80

8. POUŽITÁ LITERATÚRA 83

9. SPRÁVNE ODPOVEDE 84

Predhovor

„Hrozba antimikrobiálnej rezistencie je reálna tu a teraz. Svetová zdravotnicka organizácia upozorňuje, že ak sa súčasné trendy nezmenia, rezistentné infekcie by mohli do roku 2050 spôsobiť takmer 10 miliónov úmrtí ročne“ (WHO, 2024). Takéto a ďalšie podobné vyhlásenia nás varujú, aby sme podnikali príslušné kroky a opatrenia na správnu diagnostiku a prevenciu šírenia rezistentných pôvodcov infekčných chorôb.

Infekčné ochorenia predstavujú jednu z najväčších výziev modernej medicíny. Dynamicky sa meniace spektrum patogénov, narastajúca antimikrobiálna rezistencia, rozvoj pokročilých diagnostických technológií a zároveň rastúce nároky na rýchlu, presnú a dostupnú diagnostiku kladú vysoké nároky na vedomosti budúcich aj súčasných zdravotníckych pracovníkov. Hlavným zámerom učebných textov je poskytnúť ucelený prehľad mechanizmov antimikrobiálnej rezistencie a princípov diagnostiky infekčných ochorení, od tradičných mikrobiologických metód až po tie najmodernejšie, vrátane využívania umelej inteligencie. Osobitný dôraz je kladený na vzťah medzi laboratórnou diagnostikou a cielenou farmakologickou liečbou, ktorá v ére narastajúcej rezistencie a variability odpovede pacienta na liečbu tvorí základ personalizovaných terapeutických stratégií.

Učebné texty sú primárne určené pre študentov všeobecného lekárstva, ale vzhľadom na širokospektrálne zameranie môžu byť vhodné aj pre študentov príbuzných biomedicínskych odborov. Ako doplnkový študijný materiál ich môžu využiť aj doktorandi, lekári a zdravotnícki pracovníci v klinickej praxi, ktorí majú záujem prehĺbiť si poznatky z oblasti diagnostiky infekčných ochorení.

Jednotlivé kapitoly sú koncipované tak, aby čitateľa postupne previedli od základných biologických vlastností mikroorganizmov, cez mechanizmy rezistencie, až po diagnostické prístupy využívané v rutinnej praxi a ich bezprostrednú väzbu na terapeutické rozhodovanie. Súčasťou sú aj vybrané moderné metódy, ktorých širšie klinické využitie sa predpokladá v nasledujúcich rokoch. Každá kapitola je doplnená kontrolnými otázkami, ktoré študentom umožňujú priebežne si overiť úroveň pochopenia a zároveň slúžia ako vhodná forma prípravy na skúšky.

Veríme, že tieto učebné texty budú pre čitateľov nielen zdrojom teoretických poznatkov, ale predovšetkým praktickým sprievodcom, ktorý im pomôže lepšie porozumieť významu rýchlej a presnej diagnostiky infekčných ochorení v kontexte modernej, bezpečnej a personalizovanej farmakoterapie.

Autori

1. KLASIFIKÁCIA INFEKČNÝCH OCHORENÍ

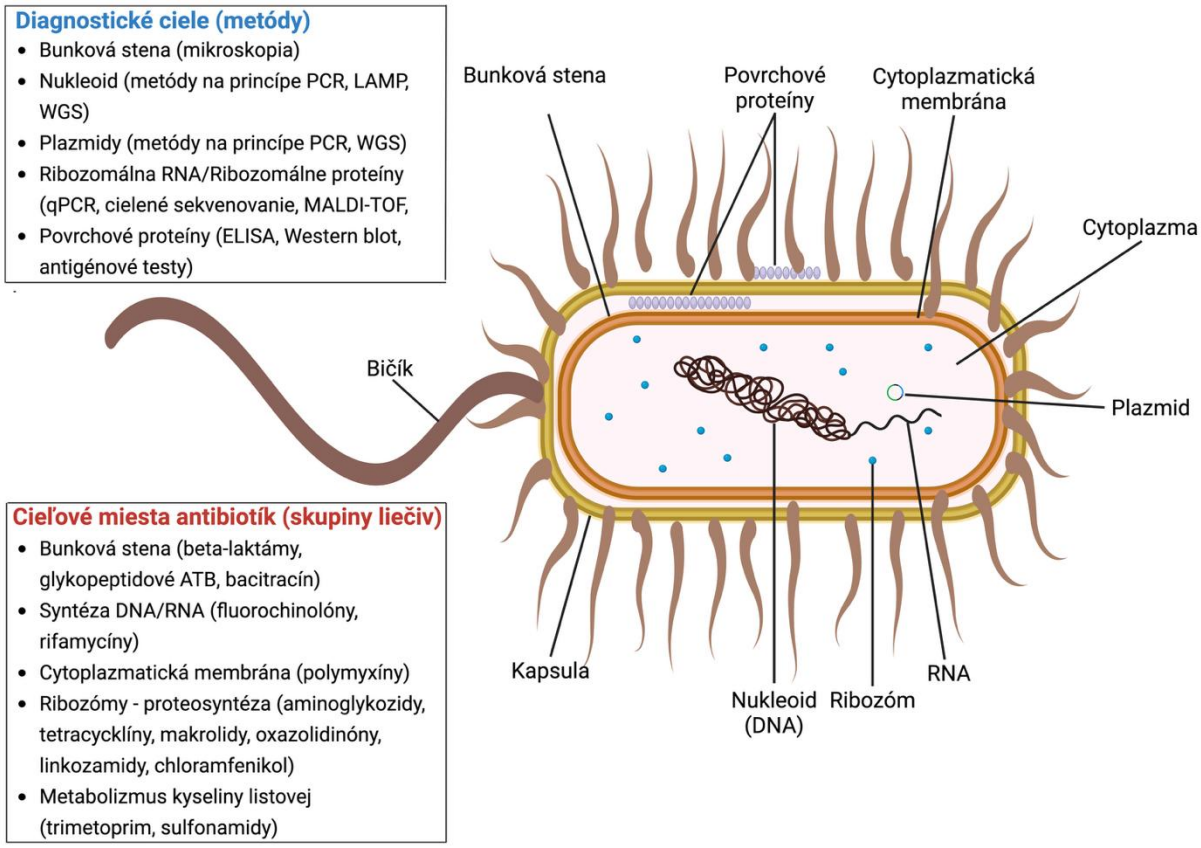
Primárna klasifikácia prebiehajúceho infekčného ochorenia predstavuje východiskový bod, ktorý vedie k vhodnému výberu diagnostického postupu a zároveň vyžaduje medziodborovú komunikáciu. Rôzne skupiny infekcií sa totiž môžu líšiť nielen pôvodcami, ale aj ich špecifickou lokalizáciou v tele, ktorá predurčuje výber správnej diagnostickej metódy, ako aj farmakoterapeutický prístup (výber vhodného antibiotika a jeho spôsob podania).

1.1. Podľa pôvodcu

Infekčné ochorenia možno klasifikovať podľa rôznych kritérií, pričom jedným z najčastejšie používaných a najpraktickejších v klinickej medicíne je klasifikácia podľa typu pôvodcu. Tento prístup umožňuje systematické pochopenie biologických vlastností mikroorganizmov, mechanizmov patogenézy, prenosu, ako aj možností diagnostiky a liečby.

1.1.1. Bakteriálne infekcie

Baktérie sú jednobunkové prokaryotické mikroorganizmy, ktorých genetická informácia je uložená vo forme dlhej kruhovej molekuly DNA. Ich DNA nie je obalená jadrovou membránou, a teda nevytvára pravé jadro (obr. 1). Cytoplazma baktérií, na rozdiel od eukaryotických buniek, neobsahuje žiadne membránovo ohraničené organely. Jedinými prítomnými organelami sú ribozómy (70S) zúčastňujúce sa proteosyntézy. Práve ribozómy sú cieľom účinku viacerých skupín antibiotík (napríklad aminoglykozidov, makrolidov, tetracyklínov), ktoré selektívne inhibujú proteosyntézu. Mnohé baktérie sú pohyblivé a disponujú charakteristickým usporiadaním bičíkov, ktoré im umožňujú aktívny pohyb. Povrch bakteriálnej bunky je tvorený zložitou bunkovou stenou, ktorú často obklopuje hrubá polysacharidová kapsula. Hlavnou štrukturálnou zložkou bunkovej steny je peptidoglykán (nazývaný aj mukopeptid alebo mureín), tvorený striedajúcimi sa jednotkami N-acetylglukozamínu a N-acetylmurámovej kyseliny, prepojenými krátkymi reťazcami aminokyselín. Hrúbka a organizácia peptidoglykánovej vrstvy je rozhodujúcim faktorom pri farbení podľa Grama a ovplyvňuje aj citlivosť na antibiotiká. Syntéza peptidoglykánu je cieľom viacerých dôležitých skupín antibiotík, najmä β-laktámov (napr. penicilínov, cefalosporínov) a glykopeptidov (napr. vankomycínu).



Obr. 1: *Základná stavba bakteriálnej bunky a ciele laboratórnej diagnostiky a vybraných skupín antibiotík*

Baktérie sa rozmnožujú nepohlavným delením, najčastejšie priečnym delením bunky. U väčšiny druhov prebieha delenie veľmi rýchlo, napríklad *Escherichia* (*E.*) *coli* sa za optimálnych podmienok delí približne každých 20 minút. Niektoré baktérie však rastú výrazne pomalšie. Typickým príkladom sú mykobaktérie, ako *Mycobacterium* (*M.*) *tuberculosis*, ktorých generačný čas (čas potrebný na zdvojnásobenie populácie) môže presiahnuť 20 hodín. Takýto pomalý rast má zásadné dôsledky pre diagnostiku aj liečbu.

Metabolické vlastnosti baktérií sú mimoriadne rozmanité. Z hľadiska vzťahu ku kyslíku rozlišujeme:

- **Aeróbne baktérie**, ktoré vyžadujú kyslík ako konečný akceptor elektrónov v dýchacom reťazci. Príkladom sú *Pseudomonas* (*P.*) *aeruginosa* alebo *M. tuberculosis*. Tieto baktérie sa bežne nachádzajú v prostredí bohatom na kyslík (napr. pľúcne tkanivo) a využívajú aeróbnu respiráciu ako hlavný zdroj energie.
- **Anaeróbne baktérie**, ktoré rastú v prostredí bez prítomnosti kyslíka. Obligátne anaeróby vykazujú úplnú intoleranciu voči kyslíku, ktorý má pre ne toxický až letálny účinok v dôsledku chýbajúcich obranných mechanizmov proti reaktívnym formám kyslíka (napr. *Clostridium perfringens*). Fakultatívne anaeróby disponujú metabolickou plasticitou, čo znamená, že za dostupnosti kyslíka využívajú aeróbnu respiráciu, avšak pri jeho chýbaní prechádzajú na fermentačné alebo iné anaeróbne metabolické procesy (napr. *E. coli*).

Diagnostika bakteriálnych infekcií je založená na detekcii vybraných fenotypových a genotypových znakov príslušných baktérií. Z klinického hľadiska mali v minulosti najväčší praktický význam fenotypové charakteristiky, ako sú morfológia, rastové podmienky, enzymatická aktivita či schopnosť fermentácie, ktorých správna interpretácia si vyžaduje dôkladné poznanie štruktúry a biologických vlastností baktérií. V súčasnosti však čoraz väčšiu rolu zohrávajú molekulárno-biologické metódy, ktoré umožňujú presnejšiu, rýchlejšiu a často aj špecifickejšiu identifikáciu mikroorganizmov (obr. 1).

Klinicky významné baktérie

V súvislosti s narastajúcou globálnou hrozbou antimikrobiálnej rezistencie vydala Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) v roku 2024 aktualizovaný zoznam prioritných bakteriálnych patogénov. Identifikuje v ňom také druhy baktérií, ktoré predstavujú najvážnejšie riziko pre verejné zdravie z dôvodu multirezistencie (MDR) a obmedzených terapeutických možností.

Patogény sú v ňom zoradené do troch kategórií – kritickej, vysokej a strednej priority – podľa naliehavosti potreby vývoja nových antimikrobiálnych látok. Medzi najvýznamnejšie patria:

- **kritická priorita**: karbapenem-rezistentné gram-negatívne baktérie (*Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*), enterobaktérie produkujúce karbapenemázy (*Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*) a *M. tuberculosis* (rifampicín-rezistentné),
- **vysoká priorita**: meticilín-rezistentný *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* (MRSA), vankomycín-rezistentný *Enterococcus* (*E.*) *faecium*, klaritromycín-rezistentný *Helicobacter pylori* a druhy ako *Campylobacter*, *Salmonella* a *Neisseria* rezistentné na fluorochinolónové antibiotiká,
- **stredná priorita**: penicilín-rezistentný *Streptococcus pneumoniae*, ampicilín-rezistentný *Haemophilus influenzae* a druhy *Shigella* rezistentné na fluorochinolónové antibiotiká.

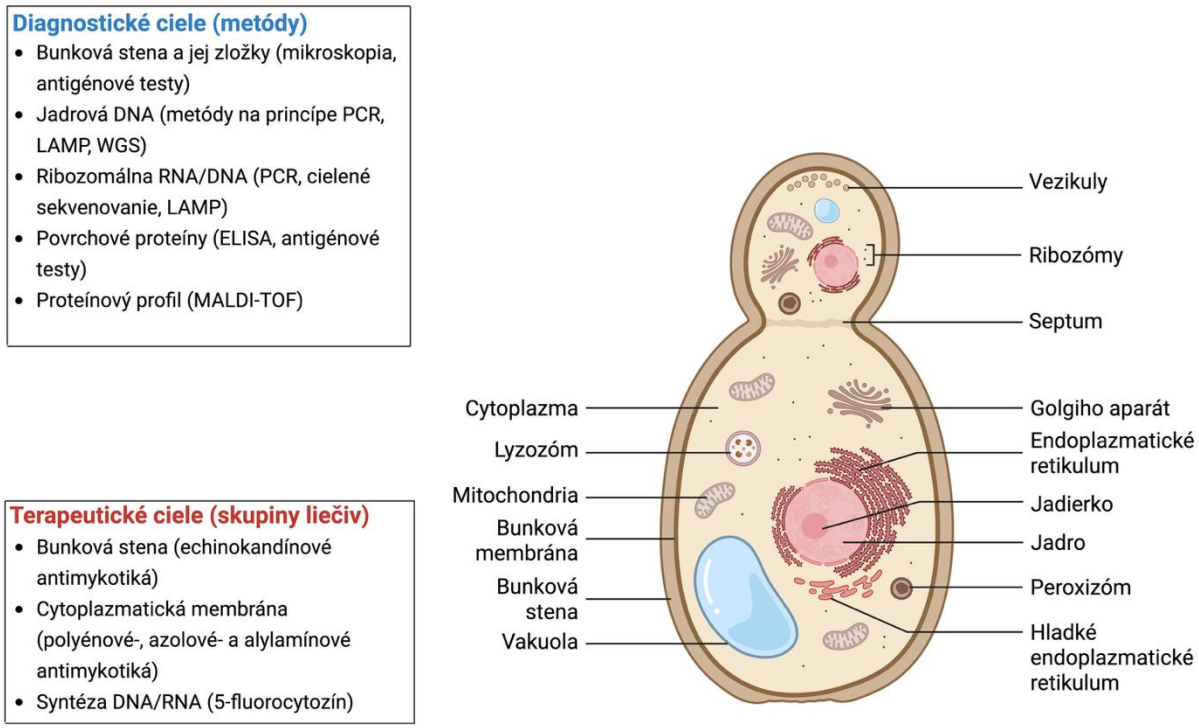
Presná, rýchla a spoľahlivá diagnostika zohráva zásadnú úlohu v manažmente týchto infekcií. Umožňuje včasnú identifikáciu rezistentných kmeňov, cielenú liečbu a zároveň obmedzuje preskripciu širokospektrálnych antibiotík, čím pomáha redukovať selekčný tlak vedúci k ďalšiemu šíreniu a rozvoju rezistencie. Z tohto dôvodu WHO vo svojich odporúčaniach dôrazne apeluje na posilnenie mikrobiologických kapacít v zdravotníckych zariadeniach, systematické využívanie dostupnej diagnostiky a integráciu výsledkov v rámci politiky zodpovedného používania antibiotík.

1.1.2. Hubové ochorenia (mykózy)

Huby (*Fungi*) sú eukaryotické organizmy, ktoré sa síce vyznačujú niektorými spoločnými znakmi s rastlinami či živočíchmi, ale tvoria samostatnú biologickú ríšu. Z

viac ako 70 000 známych druhov húb bolo iba približne 300 identifikovaných ako patogénnych pre človeka alebo zvieratá. V porovnaní s ľudskými bunkami však vykazujú viacero biochemických a štrukturálnych odlišností, ktoré predstavujú dôležité ciele pre antifungálne liečivá a sú kľúčové v diagnostike.

Bunková stena húb je tvorená prevažne polysacharidmi – chitozánom (chitínom), β-1,3- a β-1,6-glukánmi, manánmi a rôznymi glykoproteínmi (obr. 2). Jej syntéza je inhibovaná antifungálnymi liečivami zo skupiny echinokandínov (napr. kaspofungín, mikafungín, anidulafungín). Cytoplazmatická membrána húb obsahuje ako hlavnú sterolovú zložku ergosterol, ktorý je cieľovým miestom azolových, alylamínových a polyénových antifungálnych liečiv (obr. 2). DNA a RNA húb majú rovnaké chemické zloženie a základné štrukturálne vlastnosti ako u všetkých eukaryotov,. Rozdiel však spočíva v enzýmoch a metabolických dráhach, ktoré sa podieľajú na biosyntéze a spracovaní prekurzorov nukleových kyselín. Práve tieto odlišnosti umožňujú selektívne zacielenie antifungálnej liečby (liečivo flucytozín).



Obr. 2: *Základná stavba bunky húb a ciele laboratórnej diagnostiky a vybraných skupín antifungálnych liečiv*

Klinicky významné huby

Väčšina klinicky významných mykotických infekcií (mykóz) má charakter oportúnnych ochorení, ktoré vznikajú u predisponovaných jedincov pri narušení fyziologických obranných mechanizmov (oslabený imunitný systém, narušený mikrobióm alebo narušením krycej sústavy). Spektrum ochorení spôsobených patogénnymi hubami

je široké a zahŕňa povrchové mykózy (napr. kože, vlasov a nechtov), slizničné kandidózy, ale aj invazívne systémové infekcie, ktoré môžu byť závažné, až život ohrozujúce (tab. 1).

Invazívne mykózy predstavujú závažnú klinickú výzvu súčasnej medicíny, najmä v kontexte rastúceho počtu pacientov s oslabenou imunitou a zložitými terapeutickými zásahmi.

K najdôležitejším predispozičným faktorom patrí:

- imunosupresívna liečba, napríklad po transplantácii orgánov alebo hematopoetických kmeňových buniek,
- dlhodobá liečba širokospektrálnymi antibiotikami, ktoré narúšajú prirodzenú mikrobiálnu rovnováhu,
- prítomnosť cievnych katétrov, implantovaných zariadení a invazívnych výkonov, ktoré umožňujú priamy prienik patogénov do organizmu,
- primárne alebo sekundárne imunodeficiencie, vrátane infekcie spôsobené vírusom ľudskej imunitnej nedostatočnosti (HIV), onkohematologických ochorení či malnutrície.

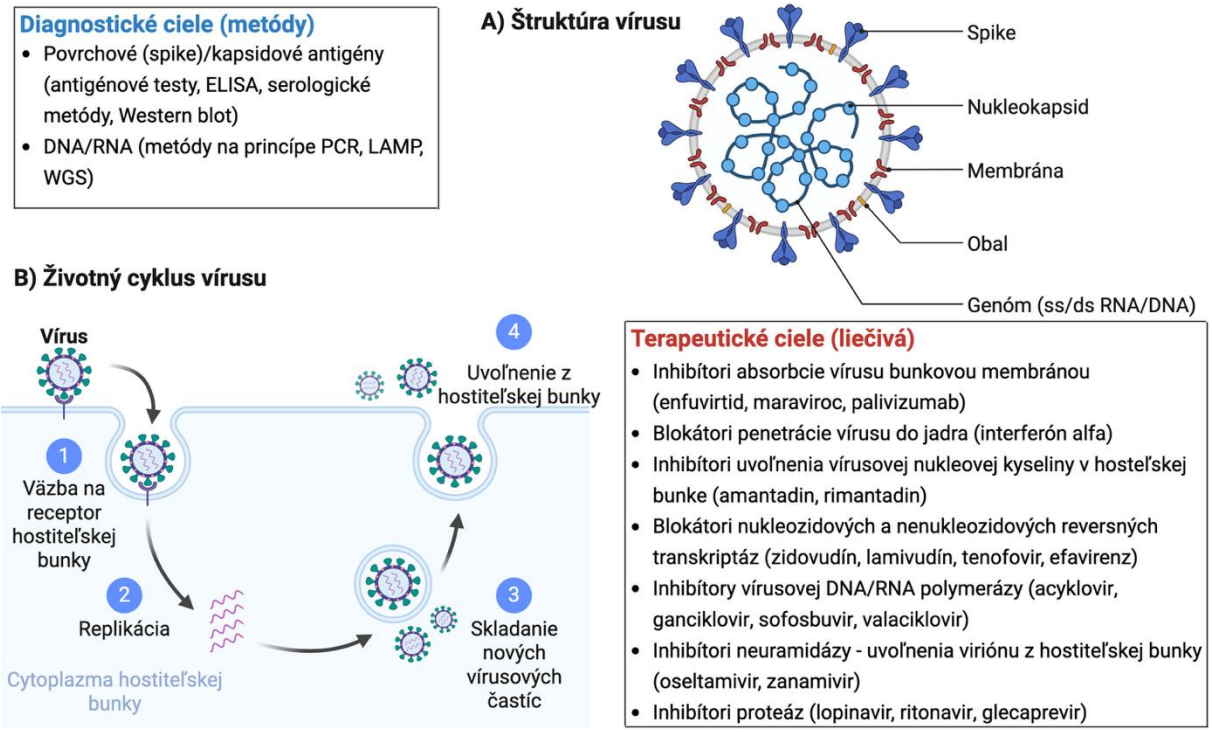
Uvedené predispozičné faktory vytvárajú prostredie, v ktorom dochádza k rozvoju invazívnych mykóz spôsobených bežne nepatogénnymi alebo environmentálnymi hubami. Tento stav významne prispieva k zvýšenej incidencii a mortalite infekcií, najmä v nemocničnom prostredí s vysokou koncentráciou imunokompromitovaných pacientov. Je preto nevyhnutné venovať zvýšenú pozornosť včasnej diagnostike, monitorovaniu rizikových pacientov a racionálnemu prístupu k terapii týchto infekcií.

Tab. 1: *Prehľad základných typov mykóz a ich najčastejších pôvodcov*

Typ mykózy	Postihnuté miesto/tkanivo	Najčastejší pôvodcovia
Povrchová	Rohovina kože, vlasy, nechty	*Trichosporon, Malassezia, Exophiala*
Slizničná	Ústna dutina, vagína, pažerák	*Candida (C.) albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*
Kožná a kožnoslizničná	Koža, kožné záhyby, intertriginózne a interdigitálne oblasti	*Microsporum, Trichophyton, Epidermophyton*
Subkutánna	Podkožie	*Sporothrix schenckii*, *Fonsecaea* spp., *Cladophialophora spp.*
Systémová	Krv, pľúca, CNS, pečeň, slezina, GIT	*Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Mucorales*, *Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis, Pneumocystis jirovecii*

1.1.3. Vírusové infekcie

Vírusy predstavujú najmenšie známe infekčné agensy, ktoré sa zásadne líšia od ostatných mikroorganizmov svojou štruktúrou, metabolizmom a spôsobom replikácie (obr. 3). Veľkosť vírusových častíc (viriónov) je veľmi variabilná (18–400 nm). Aj keď vírusy nesú genetickú informáciu vo forme jednovláknovej (ss) alebo dvojvláknovej (ds) DNA alebo RNA, neobsahujú vlastný proteosyntetický aparát (chýbajú im ribozómy, transferová RNA, translačné enzýmy a ďalšie štruktúry potrebné na expresiu génov). Z tohto dôvodu sú metabolicky neaktívne a nie sú schopné samostatnej transkripcie ani translácie. Replikácie sú schopné len po vstupe do živej hostiteľskej bunky, v ktorej úplne závisia od transkripčných, translačných a replikačných mechanizmov hostiteľa. Ide teda o obligátne intracelulárne patogény, ktoré si nevedia zabezpečiť žiadnu fázu syntézy vírusových zložiek bez aktívnej spoluúčasti hostiteľskej bunky. Práve jednotlivé kroky životného cyklu vírusov sú cieľovými miestami v súčasnosti využívaných antivirotík (obr. 3). Podobne ako baktérie, aj vírusy môžu podliehať selektívnemu tlaku liečby, čo vedie k vzniku rezistentných kmeňov. Rezistencia vzniká najčastejšie mutáciou vírusového genómu v oblastiach, ktoré kódujú cieľové štruktúry antivirotík (napr. enzýmy ako reverzná transkriptáza, polymeráza alebo proteáza).



Obr. 3: *Základná stavba a životný cyklus vírusu a ciele laboratórnej diagnostiky a vybraných skupín antivirotík*

Štruktúrna organizácia vírusov sa medzi jednotlivými skupinami líši, no existujú niektoré všeobecné spoločné znaky, ktoré definujú ich základnú stavbu (okrem typu nukleovej kyseliny):

a) **Kapsida** (bielkovinový obal) – je základnou funkčnou jednotkou viriónu a pozostáva z jednotlivých proteínových podjednotiek nazývaných kapsoméry. Jeho funkciou je ochrana nukleových kyselín a tiež sa podieľa na rozpoznávaní hostiteľskej bunky. Kombinácia genómu a kapsidu tvorí tzv. nukleokapsid.

b) **Symetria viriónu** - usporiadanie kapsomér určuje celkový tvar vírusu, typicky ikosahedrálny, helikálny alebo komplexný. Táto symetria je dôležitá pri identifikácii vírusov pomocou elektrónovej mikroskopie.

c) **Obal** - niektoré vírusy sú tvorené iba nukleokapsidom (tzv. neobalené vírusy). Iné majú lipidový obal pochádzajúci z bunkovej membrány hostiteľa, do ktorého sú vložené vírusové proteíny a glykoproteíny. Tento obal zohráva významnú úlohu v prichytení vírusu na bunkový receptor a pri vstupe do hostiteľskej bunky. Zároveň robí vírus citlivejším voči rôznym fyzikálnym faktorom, čo ovplyvňuje spôsob prenosu a samotnú patogenézu.

Klinicky významné vírusy

Vírusov je známych niekoľko tisíc druhov, avšak iba relatívne malá skupina vírusov je zodpovedná za väčšinu klinicky významných infekcií (tab. 2). Spôsobovať môžu akútne, chronické, latentné alebo onkogénne ochorenia, pričom viaceré z nich sú spojené s vysokou morbiditou a mortalitou, najmä u rizikových skupín pacientov (napr. imunokompromitovaní, novorodenci, starší pacienti).

Tab. 2: *Vírusy s najväčším klinickým a epidemiologickým dopadom*

Vírus	Rod / čeľaď	Typ nukleovej kyseliny	Ochorenia
HIV	*Retroviridae / Lentivirus*	ssRNA (+), reverzná transkripcia	AIDS
HBV (vírus hepatitídy B)	*Hepadnaviridae*	dsDNA (cirkulárna, parciálne dvojvláknová)	Chronická hepatitída B, hepatocelulárny karcinóm
HCV (vírus hepatitídy C)	*Flaviviridae*	ssRNA (+)	Chronická hepatitída C, cirhóza
HSV-1/2 (*herpes simplex* vírus)	*Herpesviridae / Simplexvirus*	dsDNA (lineárna)	Opary, genitálny herpes
VZV (*varicella-zoster* vírus)	*Herpesviridae / Varicellovirus*	dsDNA (lineárna)	Ovčie kiahne, pásový opar
CMV (cytomegalovírus)	*Herpesviridae / Cytomegalovirus*	dsDNA (lineárna)	CMV infekcia
Influenza A/B (chrípkové vírusy)	*Orthomyxoviridae / Influenzavirus*	ssRNA (-), segmentovaná	Chrípka
HPV (ľudský papilomavírus)	*Papillomaviridae*	dsDNA (cirkulárna)	Genitálne bradavice, karcinóm krčka maternice
SARS-CoV-2 (koronavírus)	*Coronaviridae / Betacoronavirus*	ssRNA (+)	COVID-19
EBV (Epstein-Barr vírus)	*Herpesviridae / Lymphocryptovirus*	dsDNA (lineárna)	Infekčná mononukleóza

1.2. Podľa miesta infekcie

Infekcie môžu postihnúť prakticky akékoľvek tkanivo či orgánový systém ľudského tela. Správna identifikácia miesta infekcie je kľúčová nielen pre terapeutický prístup, ale predovšetkým pre výber vhodného biologického materiálu na laboratórnu diagnostiku (tab. 3).

Tab. 3: *Prehľad biologického materiálu, diagnostických metód a patogénov podľa miesta infekcie*

Miesto infekcie	Odporúčaný biologický materiál	Najčastejší pôvodcovia
Horné dýchacie cesty	Výter z nosohltana/hrdla	*Streptococcus pyogenes*, vírusy (chrípka, RSV, SARS-CoV-2)
Dolné dýchacie cesty	Spútum, bronchoalveolárna laváž	*Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, vírusy
Centrálny nervový systém	Likvor	*Neisseria meningitidis*, HSV, enterovírusy
Močové cesty	Stredný prúd moču	*Escherichia coli, Klebsiella* spp.*, Enterococcus* spp.
Gastrointestinálny trakt	Stolica, rektálny výter	Enterobaktérie, *Clostridioides difficile,* norovírusy
Koža a mäkké tkanivá	Výter z ložiska, hnis, biopsia	*Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Candida* spp.
Krv (systémové infekcie)	Hemokultúry (aeróbna + anaeróbna)	*Staphylococcus aureus, E. coli, Candida* spp.
Genitálny trakt	Uretrálny/cervikálny výter, moč	*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, HSV
Oči, uši	Výter zo spojovky, sekrét z ucha	*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, HSV
Kosti a kĺby	Aspirát z kĺbu, kostná biopsia	*Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*

Zhrnutie kapitoly

Infekčné ochorenia sa v klinickej praxi primárne klasifikujú podľa pôvodcu a miesta infekcie, čo umožňuje cielene zvoliť diagnostické metódy, biologický materiál (napr. likvor pri meningitíde, hemokultúry pri systémových infekciách) aj liečebný postup. Baktérie ako prokaryotické organizmy disponujú peptidoglykánovou bunkovou stenou, 70S ribozómami a značnou variabilitou metabolických, rastových a fyziologických vlastností. Huby sú eukaryotické organizmy so špecifickou bunkovou stenou (chitín, glukány) a membránou obsahujúcou ergosterol, ktorý je cieľom viacerých antifungálnych liečiv. Klinicky významné mykózy sú prevažne oportúnne a častejšie sa vyskytujú u imunosuprimovaných pacientov. Vírusy predstavujú metabolicky neaktívne intracelulárne patogény, ktorých replikácia závisí od hostiteľskej bunky, pričom ich

jednoduchá štruktúra a mutačný potenciál výrazne ovplyvňujú možnosti antivirotickej liečby.

Kontrolné otázky (iba jedna správna odpoveď)

1. Ktorý z nasledujúcich znakov predstavuje základnú morfologickú odlišnosť baktérií od húb?
A. Ergosterol v membráne
B. Neprítomnosť jadra a organel
C. DNA v chromozómoch
D. Chitín v bunkovej stene

2. Primárnym cieľom β-laktámových antibiotík je:
A. β-glukán
B. Ergosterol
C. Peptidoglykán
D. Lipoteichová kyselina

3. Prečo sú vírusy považované za obligátne intracelulárne parazity?
A. Majú neúplnú genetickú výbavu
B. Nie sú schopné syntézy proteínov bez hostiteľskej bunky
C. Vyžadujú vysoké koncentrácie živín v extracelulárnom prostredí
D. Obsahujú iba jednovláknovú nukleovú kyselinu

4. Invazívne mykózy sú najčastejšie diagnostikované u:
A. Imunokompetentných pacientov
B. Pacientov na úzkospektrálnych ATB
C. Imunosuprimovaných pacientov
D. Pacientov po UV expozícii

5. Ktorý biologický materiál je štandardne indikovaný na laboratórnu diagnostiku infekcií dolných dýchacích ciest:
A. Moč
B. Likvor
C. Spútum/BAL
D. Výter z nosohltana

6. Hemokultúry sú indikované pri:

A. Kožných infekciách

B. Systémových infekciách

C. Genitálnych infekciách

D.Vírusových infekciách CNS

7. Ktorá vlastnosť vírusov je priamo zodpovedná za vznik antivirotickej rezistencie?

A. Schopnosť tvoriť biofilm

B. Mutácie v génoch kódujúcich cieľové enzýmy antivirotík

C. Schopnosť prežívať v pôde

D. Ich veľkosť (18–400 nm)

8. Obligátne anaeróbne baktérie sa vyznačujú tým, že:

A. Vyžadujú vysoké koncentrácie kyslíka na optimálny rast

B. V prítomnosti kyslíka prechádzajú na fermentačný metabolizmus

C. Sú schopné využívať kyslík, ale iba pri nízkych koncentráciách

D. Nie sú schopné prežiť v prostredí s prítomnosťou kyslíka

9. Mechanizmom účinku echinokandínov (napr. kaspofungín) je:

A. Tvorba pórov v bunkovej membráne húb

B. Inhibícia syntézy β-1,3-D-glukánu v bunkovej stene húb

C. Inhibícia syntézy ergosterolu

D. Inhibícia syntézy RNA

10. Ktorý materiál je najvhodnejší pre diagnostiku infekcie spôsobenej *Neisseria meningitidis*?

A. Spútum

B. Likvor

C. Moč

D. Stolica

Správne odpovede na strane 84.

2. REZISTENCIA

Antimikrobiálna rezistencia predstavuje jednu z najvážnejších hrozieb pre globálne verejné zdravie 21. storočia. Podľa odhadov WHO sa očakáva, že ak sa nezavedú účinné opatrenia, do roku 2050 by mohla práve antibiotická rezistencia spôsobovať až 10 miliónov úmrtí ročne, čím by sa stala jednou z hlavných príčin mortality. Najväčší problém predstavujú tzv. MDR patogény, ktoré sú odolné voči viacerým skupinám antibiotík, a extenzívne rezistentné baktérie (XDR), u ktorých sú možnosti liečby výrazne obmedzené. Medzi najčastejšie rezistentné patogény patria *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* a *Mycobacterium tuberculosis*. V posledných rokoch však narastá aj klinický význam rezistencie na antimykotiká a antivirotiká. Pri mykotických infekciách predstavuje problém najmä zvyšujúca sa rezistencia k azolom (napr. pri Candida spp.) a výskyt multirezistentných kmeňov (napr. Candida auris), čo vedie k potrebe použitia toxickejších alebo nákladnejších alternatív, k predlžovaniu liečby a k vyššiemu riziku zlyhania terapie. Antivírusová rezistencia (napr. pri HIV, chrípke či herpesvírusoch) môže znižovať účinnosť štandardných režimov, vyžadovať kombinovanú liečbu, častejšie monitorovanie a zmenu terapeutickej stratégie.

2.1. Prirodzená rezistencia

Prirodzená rezistencia, predstavuje vrodenú schopnosť mikroorganizmov odolávať účinku antimikrobiálnych látok v dôsledku ich geneticky podmienených, štrukturálnych alebo fyziologických vlastností. Tento typ rezistencie je nezávislý od predchádzajúcej expozície antibiotikám a nevyplýva z horizontálneho prenosu génov ani z mutačných zmien.

Prirodzená rezistencia sa môže prejavovať v dvoch formách:

A) **Vrodená rezistencia** - trvalá a univerzálne prítomná u všetkých kmeňov daného druhu alebo rodu (tab. 4). Je stabilnou súčasťou genómu baktérie a jej vznik nie je ovplyvnený kontaktom s antibiotikom.

B) **Indukovateľná rezistencia** - podmienená aktiváciou vybraných génov po expozícii antibiotikám, pričom tieto gény sú prirodzene prítomné v genóme baktérie, avšak ich expresia je regulovaná podmienkami prostredia (tab. 5). Indukovateľná rezistencia je klinicky významná najmä z dôvodu, že môže byť prehliadnutá pri rutinnom testovaní citlivosti. Preto sa v mikrobiologických laboratóriách používajú špecifické fenotypové testy (napr. D-test) a druhovo špecifické interpretačné kritériá, aby sa predišlo terapeutickému zlyhaniu v dôsledku selekcie indukovateľne rezistentných subpopulácií počas liečby.

Tab. 4: *Príklady vrodenej antimikrobiálnej rezistencie*

Mikroorganizmus	Antimikrobiálne látky, voči ktorým je prítomná prirodzená rezistencia
Rod *Bacteroides* (anaeróbne baktérie)	Aminoglykozidy, viaceré β-laktámové antibiotiká, chinolóny
Všetky gram-pozitívne baktérie	Aztreonam
Rod *Enterococcus*	Aminoglykozidy (nízke hladiny), cefalosporíny, linkozamidy
Listeria monocytogenes	Cefalosporíny
Všetky gram-negatívne baktérie	Glykopeptidy, lipopeptidy
Escherichia coli	Makrolidy
***Klebsiella* spp.**	Ampicilín
Serratia marcescens	Makrolidy
Pseudomonas aeruginosa	Sulfonamidy, ampicilín, cefalosporíny 1. a 2. generácie, chloramfenikol, tetracyklín
Stenotrophomonas maltophilia	Aminoglykozidy, β-laktámy, karbapenémy, chinolóny
***Acinetobacter* spp.**	Ampicilín, glykopeptidy

Tab. 5: *Príklady indukovateľnej antimikrobiálnej rezistencie*

Mikroorganizmus	Mechanizmus rezistencie	Indukčný faktor	Mechanizmus účinku
Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii, Serratia marcescens, Morganella morganii, Providencia stuartii, Pseudomonas aeruginosa	Produkcia indukovateľnej AmpC β-laktamázy	Cefalosporíny 1. a 2. generácie, penicilíny	Hydrolyzácia β-laktámového kruhu antibiotika
Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae	Indukovateľná expresia *erm*(*A*)/*erm*(*C*) génu	Makrolidy (napr. erytromycín)	Metylácia 23S rRNA → znížená väzba klindamycínu
Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii	Aktivácia effluxných púmp (napr. MexAB-OprM)	Chinolóny, tetracyklíny, karbapenémy	Aktívne vylučovanie antibiotika z bunky
Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium	Indukovateľná expresia *vanA*/*vanB* génov	Vankomycín, teikoplanín	Zmena štruktúry cieľového miesta

2.2. Získaná rezistencia

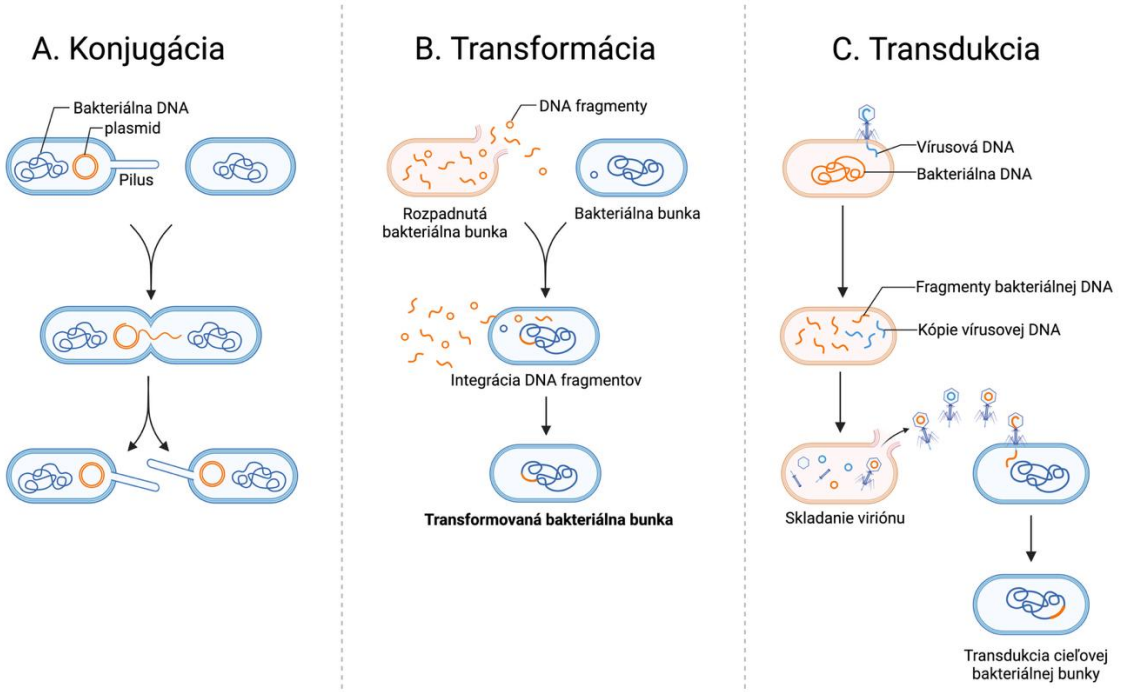
Získaná rezistencia predstavuje schopnosť mikroorganizmov odolávať účinku antibiotík v dôsledku genetických zmien alebo získania nových genetických determinantov rezistencie**.** Na rozdiel od vrodenej rezistencie, ktorá je predvídateľná pre určitý druh alebo rod, získaná rezistencia sa môže typicky objaviť len u niektorých kmeňov daného druhu a jej prítomnosť je preto nutné laboratórne overovať testovaním prostredníctvom fenotypových alebo genotypových metód.

Mechanizmy získanej rezistencie sú geneticky podmienené a vznikajú dvoma hlavnými spôsobmi:

A) **Mutáciami v genóme baktérií** - mutácie v bakteriálnom genóme môžu vzniknúť spontánne alebo ako dôsledok selekčného tlaku antibiotika. V dôsledku týchto mutácií môže dochádzať k modifikácii cieľového miesta účinku antibiotika, k zníženiu afinity antibiotika k tomuto cieľu, prípadne k zvýšenej expresii efluxných púmp, čo vedie k zníženiu intracelulárnej koncentrácie antibiotika.

B) **Horizontálnym prenosom génov** - na rozdiel od vertikálneho prenosu genetickej informácie, pri ktorom sú gény rezistencie prenášané počas delenia, horizontálny prenos génov predstavuje prenos genetického materiálu medzi rôznymi baktériami, a to aj naprieč druhmi alebo rodmi. Tento mechanizmus zohráva zásadnú úlohu pri rýchlom šírení antimikrobiálnej rezistencie v bakteriálnych populáciách.

Horizontálny prenos génov sa uskutočňuje tromi hlavnými spôsobmi (obr. 4):



Obr. 4: *Mechanizmy horizontálneho prenosu génov u baktérií – konjugácia, transformácia a transdukcia*

- **Konjugácia** – najčastejší a klinicky najvýznamnejší mechanizmus horizontálneho prenosu. Pri konjugácii dochádza k priamemu kontaktu medzi dvoma baktériami prostredníctvom štruktúr v bunkovej membráne (najčastejšie prostredníctvom pilusov), cez ktoré sa prenášajú plazmidy alebo iné mobilné genetické elementy (napr. transpozóny, integróny), ktoré môžu niesť viacero génov rezistencie, čo umožňuje vznik multirezistentných kmeňov. Tento proces je zodpovedný za vznik a šírenie viacerých epidemiologicky významných bakteriálnych druhov (napr.

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* alebo *Pseudomonas aeruginosa*) s kombinovanou rezistenciou na β-laktámové antibiotiká, aminoglykozidy či fluorochinolóny.

- **Transformácia** – ide o proces, pri ktorom baktéria prijíma voľnú DNA z prostredia, najčastejšie pochádzajúcu z rozpadnutých buniek. Ak prijatá DNA obsahuje gén rezistencie a úspešne sa integruje do genómu, baktéria nadobudne nový rezistentný fenotyp.
- **Transdukcia** – prenos genetickej informácie zabezpečujú bakteriofágy (vírusy infikujúce baktérie). Počas infekčného cyklu môžu preniesť úsek DNA z jednej baktérie do inej, čím sprostredkujú horizontálny prenos génov, vrátane génov rezistencie.

2.3. Mechanizmy antimikrobiálnej rezistencie

Bez ohľadu na to, či je antimikrobiálna rezistencia vrodená alebo získaná, jej základ spočíva v relatívne malom počte evolučne konzervovaných mechanizmov, ktorými baktérie dokážu zabrániť účinku antimikrobiálnych látok (obr. 5). Tieto mechanizmy predstavujú výsledok dlhodobého selekčného tlaku prostredia a sú zásadným prejavom adaptability mikroorganizmov.

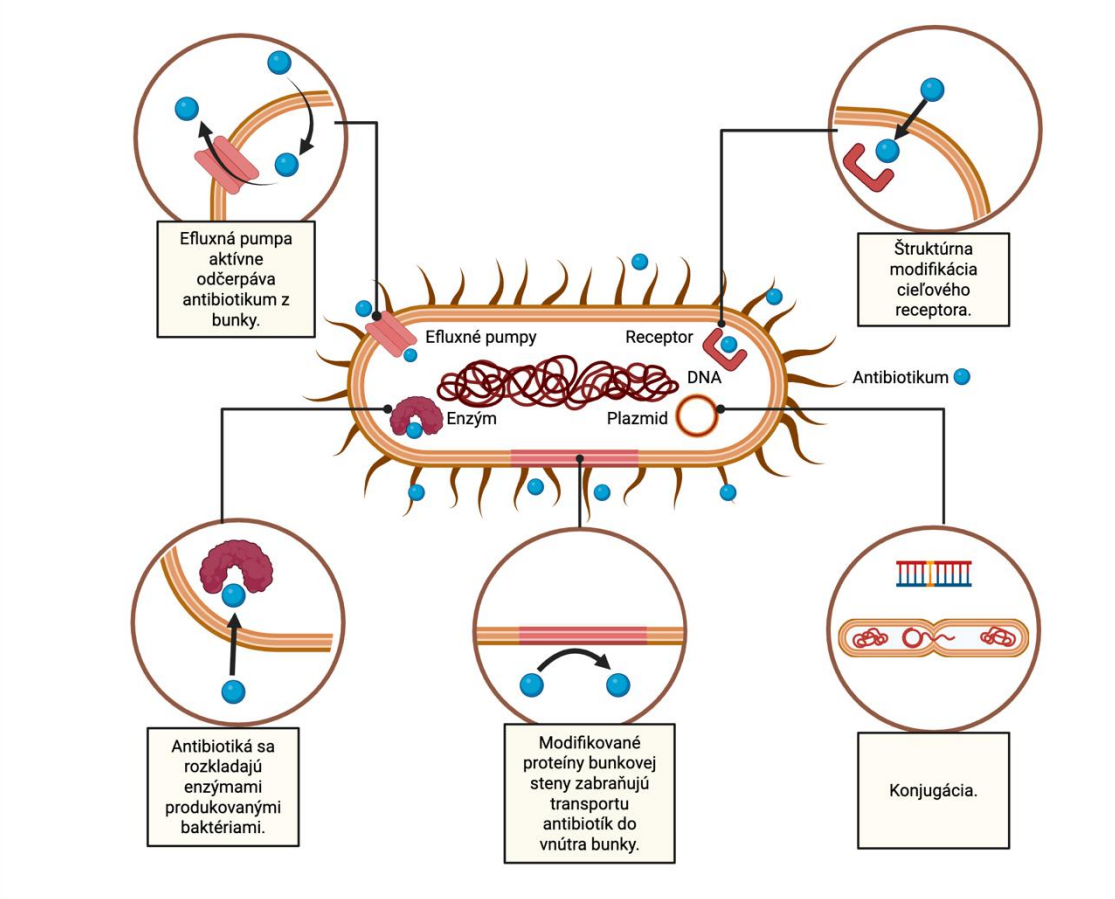
V princípe sa rozlišujú štyri hlavné mechanizmy bakteriálnej rezistencie:

A) Enzymatická inaktivácia alebo modifikácia antibiotika

Jedným z najrozšírenejších mechanizmov antimikrobiálnej rezistencie u patogénnych baktérií je enzymatická inaktivácia alebo chemická modifikácia antibiotika. Tento mechanizmus je obzvlášť efektívny, pretože nevyžaduje zmenu štruktúrnych alebo fyziologických komponentov baktérie. V porovnaní s mutáciami cieľových štruktúr teda zvyčajne nesúvisí s výraznou stratou biologickej zdatnosti (tzv. *fitness cost*).

<u>Enzymatická inaktivácia</u>

Inaktivácia predstavuje proces, pri ktorom enzým tvorený baktériami rozkladá alebo poškodzuje chemickú štruktúru antibiotika tak, že sa stáva neúčinným. Najznámejším príkladom sú β-laktamázy, ktoré hydrolyzujú amidovú väzbu β-laktámového kruhu penicilínov, cefalosporínov, monobaktámov či karbapenémov. Tieto enzýmy sa vyvinuli ako prirodzená odpoveď mikroorganizmov produkujúcich β-laktámové antibiotiká a dodnes predstavujú najrozšírenejší mechanizmus rezistencie. Špecifickým podtypom sú širokospektrálne β-laktamázy, ktoré vznikli mutáciami pôvodných β-laktamáz a poskytujú rezistenciu nielen voči penicilínom, ale aj voči novogeneračným cefalosporínom. Ďalším príkladom sú karbapenemázy, ktoré hydrolyzujú karbapenémy (napr. imipeném alebo meropeném).



Obr. 5: *Mechanizmy antimikrobiálnej rezistencie*

Mechanizmus účinku β-laktamáz je v princípe rovnaký, avšak ich lokalizácia a spôsob účinku sa líšia:

- Gram-pozitívne baktérie, najmä *Staphylococcus aureus*, produkujú β-laktamázy, ktoré sú vylučované do okolitého prostredia. Hydrolyzujú tak antibiotikum ešte predtým, ako sa dostane k cieľovému miestu (napr. penicilín viažucemu proteínu v bunkovej stene). Až 90 % klinických izolátov stafylokokov je rezistentných na penicilín v dôsledku produkcie týchto enzýmov.
- Gram-negatívne baktérie, ako *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa,* či *Acinetobacter* spp., majú β-laktamázy lokalizované v periplazmatickom priestore, kde sú strategicky umiestnené na zachytenie a hydrolýzu antibiotika, ktoré prechádza cez porínové kanály vonkajšej membrány.

Enzymatická modifikácia

Okrem priamej degradácie majú baktérie schopnosť chemicky modifikovať antibiotiká prostredníctvom špecifických enzýmov, čím znižujú ich väzbovú afinitu k cieľovému miestu.

Príklady enzymatickej modifikácie:

- Aminoglykozidy môžu byť modifikované acetyltransferázami, fosfotransferázami alebo nukleotidyltransferázami, ktoré menia hydroxylové alebo aminoskupiny liečiva a znižujú jeho väzbu na ribozomálne podjednotky.
- Makrolidy sú modifikované fosfotransferázami alebo esterázami, ktoré zabraňujú ich naviazaniu na 50S podjednotku ribozómu.
- Linkozamidy (napr. klindamycín) sú inaktivované nukleotidyltransferázami kódovanými génmi *lnu*(*A*) a *lnu*(*B*).
- Fenikoly (napr. chloramfenikol) a streptogramíny sú acetylované pomocou acetyltransferáz, čím sa mení ich konformácia a znižuje inhibičná aktivita.
- Rifamycíny, základné liečivá pri liečbe *Mycobacterium tuberculosis*, sú cieľom ADP-ribozyltransferáz, glykozyltransferáz, fosfotransferáz a monooxygenáz, ktoré menia ich chemickú štruktúru a bránia väzbe na RNA polymerázu.

B) Zmena cieľového miesta

Účinnosť väčšiny antibiotík je založená na ich špecifickej väzbe na dôležité bakteriálne cieľové štruktúry. Ak dôjde k štrukturálnej zmene cieľovej molekuly, antibiotikum stráca svoju väzbovú afinitu a tým aj účinnosť. Tento mechanizmus rezistencie patrí medzi najčastejšie a klinicky najvýznamnejšie formy získanej rezistencie.

Mutácie v cieľových génoch

Najjednoduchším spôsobom vzniku rezistencie je bodová mutácia v géne kódujúcom cieľový proteín. Mutovaný proteín si zachováva svoju fyziologickú funkciu, no antibiotikum sa naň už nedokáže účinne naviazať.

Príklady:

- Fluorochinolóny pôsobia inhibíciou DNA gyrázy (alebo aj topoizomerázy II - enzým zabezpečujúci superšpiralizáciu bakteriálnej DNA) a topoizomerázy IV (enzým zodpovedný za separáciu dcérskych chromozómov počas bunkového delenia). Mutácie v génoch *gyrA*, *gyrB, parC* alebo *parE* vedú k zníženiu väzby antibiotika na tieto cieľové enzýmy, čím vzniká rezistencia.
- β-laktámy inhibujú penicilín viažuce proteíny (PBP), ktoré sa podieľajú na syntéze bunkovej steny. Zmeny v týchto proteínoch spôsobujú zníženú väzbu β-laktámu a pokračovanie syntézy bunkovej steny aj v jeho prítomnosti. Typickým príkladom je meticilín-rezistentný *Staphylococcus aureus* (MRSA), ktorý produkuje alterovaný

PBP, kódovaný génom *mecA*. Tento proteín má nízku afinitu k všetkým β-laktámovým antibiotikám, čo robí MRSA rezistentným na penicilíny, cefalosporíny aj karbapenémy. Podobný mechanizmus sa uplatňuje pri rezistencii *Enterococcus faecium* a *Streptococcus pneumoniae*.

Posttranslačné modifikácie cieľových molekúl

Niektoré baktérie využívajú enzymatickú modifikáciu cieľovej molekuly, ktorá bráni väzbe antibiotika bez zmeny samotného génu.

Príklady:

- Metylačné zmeny rRNA spôsobené metyltransferázami sú zodpovedné za rezistenciu voči makrolidom, linkozamidom a streptogramínom. Metylácia 23S rRNA zabraňuje väzbe antibiotika na ribozóm.
- Metylačné zmeny 16S rRNA vedú k vysokej úrovni rezistencie na aminoglykozidy, pretože bránia ich väzbe na ribozomálnu podjednotku 30S.
- Pri rezistencii na kolistín je cieľový lipopolysacharid modifikovaný pridaním fosfoetanolamínu prostredníctvom špecifických transferáz, čím sa mení náboj membrány a znemožňuje interakciu s liečivom. Tento mechanizmus je buď chromozomálne kódovaný, alebo prenášaný prostredníctvom plazmidov (podkapitola 2.2)

Ochrana cieľových molekúl

Niektoré baktérie si vyvinuli proteíny, ktoré nebránia priamemu naviazaniu antibiotika, ale chránia cieľovú molekulu alebo obnovujú jej funkciu aj po naviazaní liečiva, čím znižujú účinnosť antibiotika.

Príklady:

- Qnr proteíny chránia bakteriálne topoizomerázy pred účinkom chinolónových antibiotík tým, že znižujú ich väzbu na cieľové enzýmy. Samostatne sprostredkujú len nízku úroveň rezistencie, avšak v kombinácii s mutáciami v géne *gyrA* vedú k výraznému zvýšeniu minimálnych inhibičných koncentrácií (MIC).
- FusB proteíny u *Staphylococcus aureus* poskytujú rezistenciu voči fusidovej kyseline tým, že umožňujú elongáciu proteínu aj v prítomnosti viazaného antibiotika.
- ABC-F proteíny chránia ribozóm pred antibiotikami viažucimi sa na peptidyltransferázové centrum, ako sú makrolidy, linkozamidy, streptogramíny či

pleuromutilíny. Tieto proteíny sa viažu na komplex ribozóm–antibiotikum a spôsobujú uvoľnenie antibiotika, čím obnovujú transláciu.

C) Znížená priepustnosť bunkových membrán

Účinnosť väčšiny antibiotík závisí od ich schopnosti preniknúť cez bunkové membrány baktérií. Rezistencia na princípe zníženej priepustnosti je typická pre gram-negatívne baktérie, nakoľko súčasťou ich štruktúry je vonkajšia membrána, ktorá umožňuje výmenu živín, no zároveň bráni vstupu mnohých antimikrobiálnych látok, najmä tých, ktoré sú hydrofilné alebo majú väčšiu molekulovú hmotnosť. Naopak, gram-pozitívne baktérie neobsahujú vonkajšiu membránu, a preto sú všeobecne priepustnejšie pre tieto látky. Rezistencia založená na zníženej priepustnosti je pre ne preto zriedkavejšia a zvyčajne súvisí so zmenami v zložení cytoplazmatickej membrány (napr. v pomere fosfolipidov a mastných kyselín), ktoré ovplyvňujú jej tekutosť a tým aj transport liečiv. Mykobaktérie predstavujú osobitnú skupinu, keďže ich bunková stena obsahuje hrubú lipidovú vrstvu a súčasťou mykobakteriálnej bunky je aj polysacharidový obal, čím výrazne obmedzujú vstup hydrofilných molekúl.

Zásadnú úlohu zohrávajú poríny, ktoré sa líšia svojou veľkosťou a sú súčasťou vonkajšej membrány gram-negatívnych baktérií. Práve zmeny v počte, štruktúre alebo funkcii porínov sú častou príčinou klinicky významnej rezistencie.

Príklady:

- *Klebsiella pneumoniae* často vykazuje stratu alebo štrukturálnu modifikáciu porínov vonkajšej membrány, čo vedie k zníženiu permeability pre karbapenémy a následne k rozvoju rezistencie voči týmto antibiotikám.
- Multirezistentné kmene *Esherichia coli* môžu niesť mutácie v špecifických génoch, ktoré menia elektrický náboj porínov a ovplyvňujú prienik cefotaxímu, gentamicínu či imipenému.
- U *Pseudomonas aeruginosa* je rezistencia na karbapenémy často spojená so stratou porínov, ktoré sprostredkúvajú ich transport do bunky. Tento mechanizmus býva kombinovaný s ďalšími, ako je zvýšený eflux alebo produkcia β-laktamáz.
- *Acinetobacter baumannii* disponuje len malým počtom úzko špecifických porínov, ktoré sú spojené so zníženou nepriepustnosťou pre hydrofilné antibiotiká (napríklad β-laktámy a aminoglykozidy).

D) Aktívny transport

Jedným z hlavných mechanizmov antimikrobiálnej rezistencie je aktívne odčerpávanie (resp. transport) antibiotík z bunky prostredníctvom špecializovaných transportných systémov, tzv. efluxných púmp. Tieto systémy aktívne odstraňujú molekuly antibiotík z cytoplazmy alebo periplazmatického priestoru ešte predtým, ako sa liečivo naviaže na cieľové miesto. Tým dochádza k zníženiu intracelulárnej koncentrácie antibiotika. Na rozdiel od pasívnych mechanizmov (ako znížená priepustnosť), ide v tomto prípade o aktívny proces využívajúci energiu vo forme protónového gradientu alebo ATP. Efluxné pumpy sú navyše polysubstrátové, čo znamená, že dokážu rozpoznávať a exportovať rôzne typy látok s odlišnou chemickou štruktúrou a prispievať k multirezistencii.

Grampozitívne baktérie majú jednoduchšie efluxné systémy, ktoré zvyčajne pozostávajú z jedného proteínu lokalizovaného v cytoplazmatickej membráne. Gramnegatívne baktérie využívajú viaczložkové efluxné systémy, ktoré prepájajú všetky vrstvy bunkovej steny a umožňujú priamy transport substrátu z cytoplazmy do extracelulárneho priestoru.

Niektoré baktérie majú efluxné pumpy konštitutívne exprimované, čo predstavuje prirodzený mechanizmus rezistencie. Častá je však aj získaná rezistencia, pri ktorej vplyvom selekčného tlaku antibiotika dochádza k mutáciám v génoch regulujúcich expresiu efluxných púmp, čo vedie k ich nadmernej expresii a zvýšenému vylučovaniu antibiotika z bunky. Tento mechanizmus spôsobuje pokles intracelulárnej koncentrácie antibiotika a tým aj zníženie jeho účinnosti.

Príklady:

- *Esherichia coli* – rezistencia na β-laktámy, tetracyklíny, fluorochinolóny, chloramfenikol, makrolidy.
- *Pseudomonas aeruginosa* – široké spektrum rezistencie na viaceré triedy antibiotík.
- *Acinetobacter baumannii* – rezistencia na β-laktámy, aminoglykozidy, makrolidy.
- *Neisseria gonorrhoeae* – rezistencia na penicilín, tetracyklín, makrolidy.
- *Staphylococcus aureus* – rezistencia na fluorochinolóny.

Tab. 6: *Prehľad hlavných mechanizmov antimikrobiálnej rezistencie a typických patogénov*

Mechanizmus	Najčastejšie baktérie (príklady)	Triedy ATB, ktorých sa to často týka
Enzymatická inaktivácia / modifikácia antibiotika	*Enterobacterales* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp.), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*; *Staphylococcus aureus*	β-laktámy (penicilíny, cefalosporíny, monobaktámy, karbapenémy), aminoglykozidy, makrolidy, linkozamidy, fenikoly, rifamycíny
Zmena cieľového miesta	*Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*; *Enterobacterales*	β-laktámy, fluorochinolóny, ďalšie podľa cieľa (napr. rifamycíny)
Ochrana / modifikácia cieľa (posttranslačné mechanizmy)	*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp.; *Enterobacterales*	makrolidy-linkozamidy-streptogramíny, aminoglykozidy, chinolóny, kyselina fusidová
Znížená priepustnosť bunkovej steny / membrány	*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*; *Mycobacterium tuberculosis*	najmä hydrofilné ATB; u G- výrazne β-laktámy (často vrátane karbapenémov)
Aktívny eflux	*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*	tetracyklíny, fluorochinolóny, makrolidy, chloramfenikol, β-laktámy (podľa typu pumpy)

Zhrnutie kapitoly

Antimikrobiálna rezistencia predstavuje globálny problém, podmienený schopnosťou mikroorganizmov odolávať účinku antimikrobiálnych látok prostredníctvom vrodených štrukturálnych vlastností alebo získaných genetických zmien. Vrodená a indukovateľná rezistencia vyplýva z inherentných charakteristík baktérií, ktoré zahŕňajú neprítomnosť cieľovej štruktúry, nízku priepustnosť bunkových membrán alebo regulovanú syntézu enzýmov, ktoré modifikujú vybrané skupiny antibiotík. Získaná rezistencia vzniká mutáciami v cieľových génoch po vystavení antibiotiku alebo horizontálnym prenosom génov (plazmidmi) prostredníctvom transformácie, transdukcie a najmä konjugácie.

Mechanizmy rezistencie možno zhrnúť do štyroch základných stratégií: enzymatickej inaktivácie alebo chemickej modifikácie antibiotika, zmeny cieľového miesta, zníženej permeability bunkovej membrány a aktívneho efluxu. Tieto mechanizmy sa často kombinujú a podmieňujú vznik multirezistentných a extenzívne rezistentných kmeňov významných klinických patogénov, vrátane *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* a *Mycobacterium tuberculosis*. Systematické pochopenie týchto procesov je

nevyhnutné v diagnostike rezistentných patogénov a následnom nastavení vhodného liečebného režimu.

Kontrolné otázky (iba jedna správna odpoveď)

1. Ktoré tvrdenie najlepšie charakterizuje prirodzenú (vrodenú) rezistenciu?
A. Vzniká vplyvom génových mutácii ako odpoveď na antibiotickú liečbu.
B. Je stabilne prítomná u všetkých kmeňov daného druhu.
C. Prenáša sa len prostredníctvom plazmidov.
D. Vzniká len po dlhodobom vystavení baktérie nízkym dávkam antibiotík.

2. Ktorý mechanizmus umožňuje horizontálny prenos génov naprieč druhmi a je najvýznamnejší pre vznik MDR?
A. Konjugácia
B. Transdukcia
C. Transformácia
D. Sporulácia

3. Prirodzená rezistencia niektorých gram-negatívnych baktérii na makrolidové antibiotiká je zapríčinená:
A. Produkcia makrolid-hydrolyzujúcich enzýmov
B. Produkcia beta-laktamáz
C. Alterácia cieľového miesta
D. Nepriepustnosť vonkajšej membrány

4. Prečo indukovateľná rezistencia nemusí byť zachytená rutinným testom citlivosti?
A. Testy sa vykonávajú pri príliš nízkej teplote.
B. K rezistencii dochádza až po kontakte s antibiotikom.
C. Baktérie počas testu neuvoľňujú príslušné enzýmy.
D. Antibiotikum je vždy degradované v agare.

5. Z akého dôvodu je modifikácia cieľového miesta antibiotík (napr. metylácia rRNA) často spojená s multirezistenciou?
A. Metylácia zároveň aktivuje efluxné pumpy.
B. Metylácia degraduje antibiotiká.
C. Rovnaké väzbové miesto zdieľa viac tried antibiotík.
D. Ribozómy prestanú fungovať.

6. U pacienta diagnostikovaného s infekciou mäkkých tkanív bol ako pôvodca potvrdený *Staphylococcus aureus* rezistentný na všetky β-laktámové antibiotiká. Najpravdepodobnejší mechanizmus je:

A. Aktivácia efluxných púmp
B. Mutácia 16S rRNA
C. Enzymatická degradácia β-laktámových antibiotík
D. Alterácia cieľového miesta (PBP)

7. Prečo je kombinovaná liečba účinná pri prevencii vzniku rezistencie u mykobaktérií?

A. Jednotlivé liečivá zasahujú odlišné molekulárne ciele, čím sa minimalizuje riziko selekcie mutantov rezistentných voči jednej látke.
B. Mykobaktérie disponujú vrodenou citlivosťou výlučne na kombinované liečebné režimy.
C. Kombinované režimy primárne redukujú farmakologickú toxicitu jednotlivých látok.
D. Kombinovaná terapia znižuje selekčný tlak antibiotík.

Správne odpovede na strane 84.

3. TRADIČNÉ MIKROBIOLOGICKÉ METÓDY

Diagnostika infekčných ochorení v klinickej mikrobiológii zahŕňa sled navzájom nadväzujúcich laboratórnych krokov, ktoré vedú k identifikácii pôvodcu a charakterizácii jeho vlastností nevyhnutných pre správne nastavenie terapeutického režimu. Medzi základné kroky patria:

A) **priame vyšetrenie** klinického materiálu – mikroskopická a/alebo antigénová detekcia prítomnosti mikroorganizmu priamo vo vzorke,
B) **kultivácia** mikroorganizmu – umožňuje jeho izoláciu a namnoženie v laboratórnych podmienkach,
C) **identifikácia** izolovaného agensu a testovanie jeho vlastností, vrátane **citlivosti** na antimikrobiálne látky,

3.1. Mikroskopia

Mikroskopia patrí medzi najčastejšie používané metódy v klinickej mikrobiológii. Uplatňuje sa pri priamom vyšetrení klinického materiálu ako aj pri charakterizácii mikroorganizmov po ich kultivácii.

Použitý typ mikroskopie závisí od druhu mikroorganizmu a typu vzorky. V klinických laboratóriách sa najčastejšie využívajú:

- **svetelná mikroskopia** – štandardná forma optickej mikroskopie, najčastejšie využívaná na detekciu mikroorganizmov farbených podľa Grama alebo Ziehl–Neelsena,
- **fluorescenčná mikroskopia** – využíva fluorescenčné farbivá (fluorochrómy) viažuce sa špecificky na patogény, umožňuje rýchlu a citlivú detekciu (napr. mykobaktérií, vírusov alebo parazitov).

Iné typy, ako mikroskopia temného poľa či elektrónová mikroskopia, sa v rutinných klinických laboratóriách používajú len výnimočne a sú doménou referenčných alebo výskumných pracovísk (tab. 7).

Tab. 7: *Využitie mikroskopických metód v závislosti od typu organizmu*

Typ organizmu	Svetelná mikroskopia	Fluorescenčná mikroskopia	Mikroskopia tmavého poľa	Elektrónová mikroskopia
Baktérie	+	+	±	+
Huby	+	+	–	–
Parazity	+	+	–	±
Vírusy	–	+	–	±

\+ - bežne využívaná, ± - obmedzené využitie, – - takmer nevyužívaná

Základné farbenia

Farbiace techniky môžu byť aplikované priamo na klinickom materiáli, alebo na preparátoch pripravených z kultivovaných mikroorganizmov. Priame farbenie zo vzorky umožňuje rýchlu orientačnú informáciu o prítomnosti a množstve mikroorganizmov, ako aj o type ostatných buniek prítomných v materiáli, napríklad leukocytoch, či epitelových bunkách.

A) Farbenie podľa Grama

Gramovo farbenie je základná farbiaca metóda v klinickej mikrobiológii, ktorá sa primárne používa na rozlíšenie gram-pozitívnych a gram-negatívnych baktérií na základe rozdielnej stavby ich bunkovej steny (najmä obsahu peptidoglykánu). Grampozitívne baktérie (napr. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) si po odfarbení alkoholom zachovávajú fialové sfarbenie vďaka hrubej vrstve peptidoglykánu. Gramnegatívne baktérie (napr. *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*) majú tenšiu bunkovú stenu a po odfarbení alkoholom sa následne farbia na ružovo (safranínom).

B) Farbenie podľa Ziehl-Neelsena

Používa sa na detekciu acidorezistentných baktérií, respektíve baktérií, ktoré obsahujú v bunkovej stene mykolové kyseliny (*Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp.). Preparáty sa farbia karbolfuchsínom a odfarbujú kyslým alkoholom, pričom acidorezistentné baktérie si zachovávajú červené (prípadne ružové) zafarbenie.

C) Fluorescenčné farbenie

Fluorescenčné farbenie predstavuje vysoko citlivú metódu detekcie mikroorganizmov založenú na použití fluorochrómov. Fluorochrómy emitujú svetlo určitej vlnovej dĺžky po excitácii UV alebo modrým svetlom, čím umožňujú vizualizáciu mikroorganizmov pod fluorescenčným mikroskopom.

Rozlišujeme dva hlavné typy fluorescenčných farbení:

- **klasické fluorescenčné farbenie -** pri tejto technike sa fluorochrómy priamo selektívne/neselektívne viažu na určité štruktúry mikroorganizmov. Príkladom je auramín–rhodamínové farbenie, ktoré sa používa najmä na detekciu acidorezistentných baktérií (*Mycobacterium* spp.), často ako senzitívnejšia alternatíva k farbeniu podľa Ziehl–Neelsena,
- **imunofluorescencia (priama alebo nepriama) -** ide o techniku, pri ktorej je fluorescenčné farbivo naviazané na špecifickú protilátku. Táto protilátka sa selektívne viaže na povrchové antigény cieľového patogénu. Imunofluorescencia sa používa na priame dôkazy špecifických baktérií, ako napríklad *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia trachomatis*, ale aj pri detekcii vírusov či parazitov (napr. *Pneumocystis jirovecii*).

3.2. Kultivácia

Kultivácia predstavuje základnú mikrobiologickú metódu, ktorej cieľom je umožniť rast mikroorganizmov (najčastejšie baktérií) mimo ich prirodzeného prostredia. Spočíva v prenose mikroorganizmov z miesta infekcie na živné pôdy alebo do špeciálnych médií, ktoré simulujú podmienky potrebné na ich množenie**.** Po náraste v kultivačnom médiu sa bakteriálne kolónie zvyčajne dajú pozorovať voľným okom bez potreby mikroskopie, čo umožňuje následnú identifikáciu pomocou biochemických, imunologických alebo molekulárnych metód.

Prechod z *in vivo* prostredia hostiteľa do *in vitro* laboratórnych podmienok však predstavuje pre mikroorganizmy značnú výzvu. V ľudskom organizme prežívajú v špecifických metabolických a fyziologických podmienkach, pričom využívajú komplexné interakcie s tkanivami hostiteľa. Náhla zmena prostredia znamená, že ich prežitie a rast v laboratóriu sú podmienené dostupnosťou esenciálnych živín a vhodnými fyzikálno-chemickými podmienkami, ako sú teplota, pH a prítomnosť kyslíka. Vhodné rastové podmienky boli objasnené pre väčšinu klinicky relevantných baktérií. Existujú však aj výnimky ako napríklad *Treponema pallidum* (pôvodca syfilisu) alebo *Mycobacterium leprae* (pôvodca lepry), v prípade ktorých rastové nároky nie sú doposiaľ dostatočne objasnené.

Okrem baktérií je možné pomocou kultivácie diagnostikovať aj niektoré patogénne huby, napríklad *Candida* spp., *Aspergillus* spp. či dermatofyty. Huby sa kultivujú na špeciálnych médiách (napr. Sabouraudov agar) a vyžadujú dlhší čas inkubácie (často niekoľko dní až týždňov). Morfológia kolónií a mikroskopický vzhľad mycélia alebo kvasinkových buniek tvoria základ ich identifikácie.

Vírusy, na rozdiel od baktérií a húb, nie je možné kultivovať na bežných živných pôdach, keďže ide o obligátne intracelulárne parazity. Na ich kultiváciu sú potrebné živé bunkové línie (tzv. bunkové kultúry). Táto metóda je technicky náročná, časovo zdĺhavá a dnes je často nahrádzaná molekulárno-biologickými alebo imunologickými metódami.

Na úspešnú kultiváciu mikroorganizmov sa používajú rôzne typy živných médií, ktoré zabezpečujú potrebné podmienky na ich rast. Na základe konzistencie sa rozdeľujú na tuhé (obsahujúce agar) a tekuté média. Podľa účelu použitia v diagnostickej mikrobiológii sa rozdeľujú na:

a) **Obohacovacie médiá** - obsahujú špecifické živiny potrebné pre rast náročnejších baktérií, ktoré sa môžu v klinickej vzorke nachádzať spolu s inými, bežnejšími mikroorganizmami.
b) **Nutritívne média** - obsahujú základné živiny, ktoré podporujú rast širokého spektra baktérií, vrátane tých menej náročných. Neobsahujú žiadne inhibičné látky a nezvýhodňujú rast konkrétneho mikroorganizmu.

c) **Selektívne média** - obsahujú inhibičné látky (napr. žlčové soli, farbivá, antibiotiká), ktoré potláčajú rast niektorých mikroorganizmov a umožňujú rast len určitých vybraných druhov.
d) **Diferenciálne média** - umožňujú odlíšiť baktérie na základe ich metabolických vlastností (napr. schopnosť fermentácie sacharidov, produkcia špecifických enzýmov) pomocou farebných zmien alebo hemolytických zón.
e) **Kombinované médiá** - mnohé médiá majú viacero funkcií súčasne. Príklady: *MacConkey agar* je selektívny aj diferenciálny (gram-negatívne tyčinky + laktózová fermentácia), krvný agar je nutritívny, ale zároveň diferenciálny (typ hemolýzy: napr. beta-hemolýza *S. pyogenes*).

Rýchlosť rastu mikroorganizmov v kultivačných podmienkach sa výrazne líši v závislosti od typu patogénu. Bežné baktérie, ako napríklad *Escherichia coli* alebo *Staphylococcus aureus*, vytvárajú viditeľné kolónie už po 18–24 hodinách inkubácie. Mnohé ďalšie klinicky významné baktérie, ako sú *Brucella* spp. alebo *Campylobacter* spp., rastú 48–72 hodín. Atypické baktérie, napríklad *Legionella pneumophila* vyžadujú špeciálne podmienky a ich kultivácia môže trvať aj 5–7 dní. Mimoriadne pomaly rastú mykobaktérie, najmä *Mycobacterium tuberculosis*, pri ktorých sa prvý rast na pevných médiách objavuje často až po 2 až 6 týždňoch.

Pri hubách pozorujeme značné rozdiely medzi jednotlivými skupinami. Kvasinky ako *Candida albicans* rastú relatívne rýchlo (do 24–48 hodín). Filamentózne huby (napr. *Aspergillus* spp., dermatofyty) vyžadujú dlhší čas, pričom rast býva pozorovateľný po 3–7 dňoch, no úplné narastenie môže trvať aj 10–14 dní. Dimorfné huby, ktoré sa vyskytujú vo forme kvasiniek aj vláknitých foriem (napr. *Histoplasma capsulatum*), rastú ešte pomalšie a ich kultivácia môže trvať viac než 3–4 týždne.

Kultivácia mikroorganizmov predstavuje základný krok v mikrobiologickej diagnostike, ktorý často predchádza ďalším laboratórnym metódam. Izolácia čistej kolónie umožňuje nielen presnú identifikáciu patogénu, ale je aj nevyhnutnou podmienkou pre fenotypové testovanie citlivosti na antibiotiká a aplikáciu ďalších špecifických techník, ako sú biochemické testy, MALDI-TOF spektrometria, sérotypizácia či molekulárno-biologické metódy. Bez úspešnej kultivácie by nebolo možné zabezpečiť spoľahlivú a cielene zameranú terapiu, čo platí najmä pri infekciách spôsobených rezistentnými alebo atypickými mikroorganizmami. Kultivácia tak ostáva kľúčovým pilierom klasickej aj modernej klinickej mikrobiológie.

3.3. Biochemické testy

Po úspešnej kultivácii mikroorganizmu a jeho predbežnej identifikácii na základe morfológie a farbenia, nasleduje biochemická charakterizácia. Biochemické testy využívajú rozdiely v metabolických a enzymatických vlastnostiach mikroorganizmov.

Jednotlivé druhy mikroorganizmov sa líšia schopnosťou fermentovať alebo oxidovať určité substráty**,** produkovať špecifické enzýmy, meniť pH prostredia alebo tvoriť charakteristické metabolity a produkty degradácie. Tieto biochemické procesy sa v laboratórnych podmienkach detegujú pomocou indikátorov zmeny pH, tvorby plynu, zákalu, precipitátov alebo zafarbenia kultivačných médií či testovacích súprav. Testy môžu byť realizované samostatne alebo v rámci štandardizovaných diagnostických panelov, ktoré prestavujú súbor testovacích reakcií vo forme mikrotubičiek, ktoré obsahujú substráty pre jednotlivé biochemické reakcie.

1. Katalázový test

Test zisťuje prítomnosť enzýmu katalázy, ktorý rozkladá peroxid vodíka na vodu a kyslík. Využíva sa primárne na diferenciáciu medzi stafylokokmi a streptokokmi.

Pozitívny výsledok: *Staphylococcus* spp., *Neisseria* spp.*, Corynebacterium* spp.

Negatívny výsledok: *Streptococcus* spp., *Arcanobacterium* spp.

2. Oxidázový test

Deteguje prítomnosť cytochróm c oxidázy v respiračnom reťazci baktérie. V klinickej praxi umožňuje rýchlu diferenciácia nefermentujúcich gram-negatívnych baktérií.

Pozitívny výsledok: *Pseudomonas* spp., *Neisseria* spp., *Vibrio* spp.

Negatívny výsledok: väčšina *Enterobacteriaceae* (napr. *E. coli*, *Klebsiella* spp.)

3. Ureázový test

Test zisťuje prítomnosť enzýmu ureázy, ktorý štiepi močovinu na amoniak a oxid uhličitý. Tento proces vedie k alkalizácii prostredia, ktorú možno detegovať zmenou farby pH indikátora. Hoci test nájde uplatnenie aj pri iných mikroorganizmoch (napr. *Proteus spp.*, *Klebsiella* spp., *Cryptococcus neoformans*), najvýznamnejšia aplikácia v klinickej praxi dnes spočíva v diagnostike infekcie *Helicobacter pylori***.**

4. Indolový test

Test umožňuje rozlíšiť baktérie na základe schopnosti štiepiť tryptofán na indol. Primárne využívaný pri identifikácii enterobaktérií.

Pozitívny výsledok: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris, Klebsiella oxytoca, Vibrio* spp.

Negatívny výsledok: *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae, Salmonella* spp.*, Proteus mirabilis*

5. Test fermentácie cukrov

Mikroorganizmy môžu fermentovať (anaeróbne štiepiť) rôzne sacharidy (glukóza, laktóza, manitol, arabinóza, atď.), pričom vznikajú kyseliny alebo plyny. Výsledkom je

zmena pH, prípadne tvorba plynu. Predstavuje základný test pre rozlíšenie enterobaktérií, kvasiniek a predbežnú identifikáciu mnohých ďalších baktérií.

6. Citrátový test

Testuje schopnosť baktérií využiť citrát ako jediný zdroj uhlíka. Pozitívna reakcia vedie k alkalizácii a zmene farby médiá (z zelenej na modrú). V praxi využívaný na diferenciáciu enterobaktérií s podobným fermentačným profilom.

Pozitívny výsledok: *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.

Negatívny výsledok: *Escherichia coli*

7. Žlč-eskulínový test

Test je založený na schopnosti mikroorganizmu rozštiepiť eskulín na eskuletín a glukózu.

Pozitívny výsledok: *Enterococcus* spp. a *Streptococcus bovis/gallolyticus* (skupina D)

Negatívny výsledok: väčšina ostatných skupín streptokokov (A, B, C, G) a iné gram-pozitívne koky.

8. Test produkcie sírovodíka

Test zisťuje schopnosť mikroorganizmov produkovať sírovodík (H_2S) rozkladom zlúčenín obsahujúcich síru (napr. tiosíran sodný, cysteín, siričitany) počas metabolizmu. Primárne využívaný pri diferenciácii enterobaktérií, najmä pri identifikácii druhov *Salmonella*, *Francisella* a *Proteus*.

9. Asimilačné testy na identifikáciu kvasiniek a kvasinkových mikroorganizmov

Asimilačné testy zisťujú schopnosť kvasiniek a kvasinkových mikroorganizmov využiť konkrétnu chemickú zlúčeninu (najčastejšie cukor alebo dusíkatú zlúčeninu) ako jediný zdroj uhlíka alebo dusíka**.** Na rozdiel od fermentačných testov, ktoré sledujú rozklad substrátu spojený s produkciou kyselín alebo plynov, asimilačné testy hodnotia schopnosť rastu mikroorganizmu v prostredí, kde je daný substrát jediným zdrojom živín. Test sa vykonáva buď v tekutých médiách, alebo štandardizovaných paneloch. Asimilačné testy sa vykonávajú paralelne s viacerými substrátmi, čím vzniká druhovo špecifický rastový profil**,** využívaný pri ich identifikácii (tab. 8).

Tab. 8: *Základný asimilačný profil pre vybrané klinicky relevantné kvasinky*

Druh kvasinky	Glukóza	Maltóza	Laktóza	Trehalóza	Galaktóza	Inozitol	Rafinóza	Nitráty
Candida albicans	+	+	-	+	+	-	-	-
Candida glabrata	+	-	-	+	+	-	-	-
Candida tropicalis	+	+	-	+	+	-	+	-
Candida parapsilosis	+	+	-	+	+	-	+	-
Candida krusei	+	-	-	+	+	-	-	-
Cryptococcus neoformans	+	-	-	-	-	+	-	-
Saccharomyces cerevisiae	+	+	+	+	+	-	+	+

Zhrnutie kapitoly

Klasické mikrobiologické metódy, medzi ktoré patrí mikroskopia, kultivácia a biochemické testy, predstavujú základný pilier diagnostiky infekčných ochorení. Ich výhodou je overená spoľahlivosť, široká dostupnosť a schopnosť poskytnúť dôležité informácie nielen o prítomnosti patogénu, ale aj o jeho fenotypových vlastnostiach. Na druhej strane, nevýhodou týchto metód je najmä časová náročnosť, nakoľko mnohé patogény si vyžadujú niekoľkodňovú až týždňovú kultiváciu, čo môže oddialiť stanovenie diagnózy a začiatok cielenej liečby. Ich citlivosť môže byť obmedzená najmä v prípadoch, keď je počet mikroorganizmov v klinickej vzorke nízky, alebo ak sa pred odberom začala antibiotická liečba. Okrem toho sa výsledky niektorých biochemických a fenotypových testov môžu interpretovať subjektívne, čo vyžaduje dostatočnú skúsenosť laboratórneho personálu. V neposlednom rade je potrebné zdôrazniť, že niektoré patogény nie je možné v laboratórnych podmienkach bežne kultivovať, čo taktiež predstavuje limitáciu týchto metód.

Kontrolné otázky (iba jedna správna odpoveď)

1. Ktoré tvrdenie najlepšie vystihuje úlohu priameho mikroskopického vyšetrenia v klinickej diagnostike infekčných ochorení?

A. Nahrádza potrebu kultivácie vo väčšine infekcií.

B. Slúži len na hodnotenie kvality klinickej vzorky.

C. Spoľahlivo identifikuje baktériu až na úroveň druhu.

D. Poskytuje rýchlu orientačnú informáciu o prítomnosti mikroorganizmov.

2. Aký je hlavný dôvod, prečo niektoré patogény (napr. *Treponema pallidum*) nie je možné štandardne kultivovať?

A. Ich rast závisí výlučne od anaeróbnych podmienok.

B. Sú inhibované agarom.

C. Ich metabolické nároky nie sú v umelých médiách reprodukovateľné.

D. Majú veľmi krátky generačný čas.

3. Ktoré tvrdenie charakterizuje kombinované médiá, ako je MacConkey agar?

A. Umožňujú kultiváciu výlučne gram-pozitívnych baktérií.

B. Pôsobia ako diferenciálne aj selektívne médium zároveň.

C. Slúžia len na kultiváciu anaeróbov.

D. Používajú sa primárne na kultiváciu húb.

4. Aký význam majú asimilačné testy v klinickej diagnostike kvasiniek?

A. Všetky kvasinky majú identický fermentačný profil, ale rozdielny asimilačný profil.

B. Asimilačné profily umožňujú druhovú diferenciáciu na základe využitia špecifických substrátov.

C. Sú rýchlejšie než všetky biochemické testy.

D. Umožňujú rast výlučne patogénnych kvasiniek.

5. Ktorá vlastnosť baktérií rozhoduje o tom, že zostávajú zafarbené po farbení podľa Ziehl–Neelsena?

A. prítomnosť mykolových kyselín v bunkovej stene

B. hrúbka peptidoglykánovej vrstvy

C. tvorba kapsuly

D. aktivita katalázy

6. V čom je hlavný rozdiel medzi fermentačnými a asimilačnými testami?

A. Fermentácia prebieha len aeróbne.

B. Asimilačné testy nereflektujú metabolické vlastnosti.

C. Fermentačné testy sa používajú len pri hubách.

D. Asimilácia sleduje rast pri využívaní substrátu bez tvorby kyselín/plynov.

7. V čom spočíva hlavná výhoda imunofluorescencie oproti klasickému fluorescenčnému farbeniu?

A. Je menej technicky náročná.

B. Nevyžaduje fluorescenčný mikroskop.

C. Má vyššiu špecificitu vďaka využitiu protilátok.

D. Umožňuje súčasné testovanie citlivosti na antibiotiká.

8. Aký je základný rozdiel medzi selektívnym a diferenciálnym kultivačným médiom?
A. Selektívne médium umožňuje rozlíšenie baktérií podľa metabolizmu, diferenciálne potláča ich rast.
B. Selektívne médium potláča rast niektorých mikroorganizmov, diferenciálne umožňuje ich rozlíšenie na základe biochemických vlastností.
C. Selektívne médium sa používa len pre gram-pozitívne baktérie, diferenciálne len pre gram-negatívne.
D. Medzi selektívnym a diferenciálnym médiom nie je rozdiel.

9. Ktorá kombinácia laboratórnych krokov tvorí základ klasického diagnostického algoritmu v klinickej mikrobiológii?
A. mikroskopia → kultivácia → identifikácia a testovanie citlivosti
B. kultivácia → PCR → mikroskopia
C. sérológia → kultivácia → mikroskopia
D. PCR → mikroskopia → kultivácia

10. Ktoré médium je najvhodnejšie na kultiváciu patogénnych húb?
A. MacConkey agar
B. Sabouraudov agar
C. krvný agar
D. citrátové médium

Správne odpovede na strane 84.

4. MOLEKULÁRNE DIAGNOSTICKÉ METÓDY

Rozvoj molekulárnej biológie výrazne zmenil diagnostiku infekčných ochorení, najmä v oblastiach, kde tradičné mikrobiologické metódy narážajú na svoje limity. Molekulárne metódy umožňujú priame, rýchle a vysoko špecifické detegovanie nukleových kyselín (DNA alebo RNA) patogénov.

Tieto prístupy sa stali neoddeliteľnou súčasťou modernej klinickej mikrobiológie, a to najmä pri:

- detekcii ťažko kultivovateľných alebo pomaly rastúcich mikroorganizmov (napr. *Mycobacterium tuberculosis*),
- identifikácii génov rezistencie voči antibiotikám alebo antimykotikám,
- epidemiologickom typizovaní patogénov (napr. pri výskyte nozokomiálnych nákaz, prípadne charakterizácii ohnísk nákazy),
- monitorovaní vírusovej nálože a diferenciálnej diagnostike akútnych vírusových infekcií.

4.1. Polymerázová reťazová reakcia a jej modifikácie

Zavedenie polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) koncom 80. rokov 20. storočia predstavovalo prelomový moment v molekulárnej biológii a diagnostike. Metódu prvýkrát opísal Saiki a kol., no najväčšiu zásluhu na jej koncepcii a klinickej aplikácii má biochemik Kary Mullis, ktorý za tento objav získal v roku 1993 Nobelovu cenu za chémiu. PCR sa stala prvou metódou cielenej amplifikácie nukleových kyselín a dodnes patrí k najpoužívanejším molekulárnym technikám v biomedicínskom výskume a klinickej diagnostike.

Základným princípom PCR je amplifikácia vybraného úseku DNA pomocou cyklických zmien teploty a enzymatickej aktivity termostabilnej DNA polymerázy. Na reakciu sú potrebné:

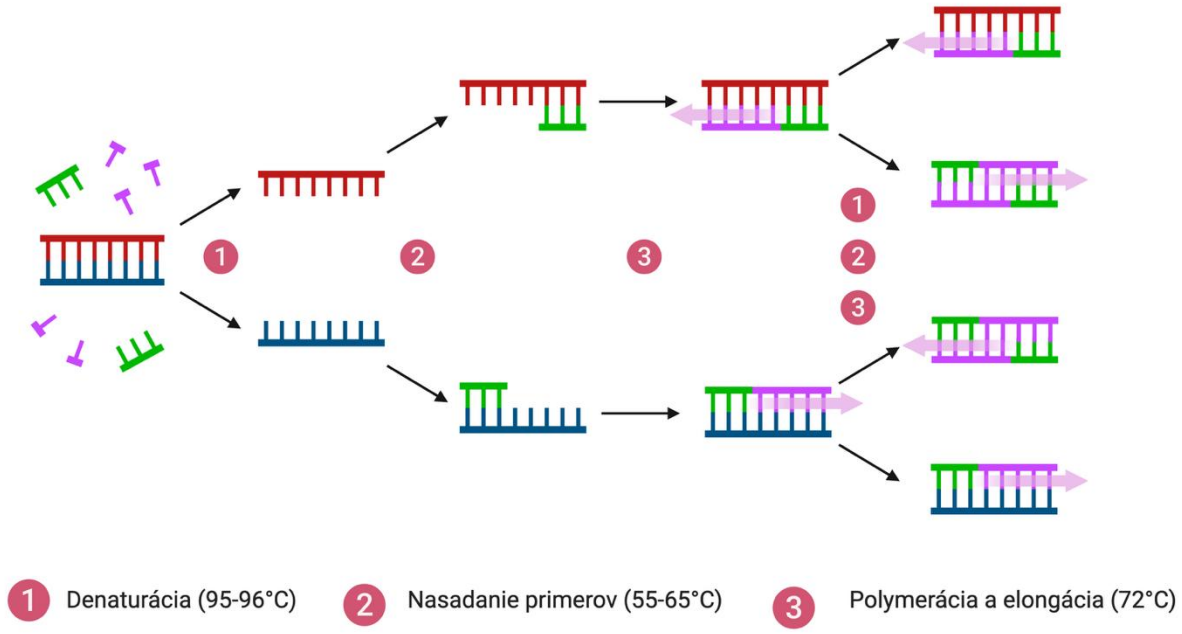
- DNA templát,
- dva krátke oligonukleotidové primery**,** ktoré určujú „okraje“ amplifikovaného úseku (typicky s dĺžkou 50–1 000 bp),
- zmes voľných deoxynukleotidových trifosfátov (dNTP),
- termostabilná DNA polymeráza.

PCR prebieha v cykloch, ktoré pozostávajú z troch hlavných krokov (obr. 6):

1. denaturácia (95–96 °C) – rozpletenie dvojvláknovej DNA,
2. nasadanie primerov (*annealing*) (55–65 °C) – nasadenie primerov na komplementárne úseky,

3. polymerácia a elongácia (pri 65–75 °C) – syntéza nového vlákna DNA pomocou polymerázy.

Tieto kroky sa opakujú v desiatkach cyklov (zvyčajne 25–40), pričom v každom cykle dochádza k exponenciálnemu nárastu množstva cieľového úseku DNA**.** Výsledkom je veľké množstvo kópií presne definovaného úseku DNA (amplikón), ktoré možno následne vizualizovať a analyzovať.



Obr. 6: *Princíp PCR*

Po ukončení amplifikačnej reakcie je potrebné overiť prítomnosť a veľkosť vzniknutých PCR produktov. V základnej (*end-point*) PCR sa na tento účel najčastejšie využíva elektroforéza v agarózovom géle, ktorá umožňuje separáciu amplikónov podľa veľkosti (resp. počtu bázových párov) v elektrickom poli.

Väčšina klinických mikrobiologických laboratórií dnes rutinne používa PCR na diagnostiku:

- vírusových infekcií (napr. HIV, CMV, HBV, HCV, SARS-CoV-2),
- bakteriálnych pôvodcov (napr. *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*),
- detekciu génov kódujúcich rezistenciu (napr. *mecA*, *blaCTX-M*, *vanA*), prípadne špecifických mutácií asociovaných s rezistenciou (napr. mutácia Ser515Thr v géne *katG* kódujúca rezistenciu na prvolíniové antituberkulotikum izoniazid).

Aktuálny prehľad všetkých PCR a iných amplifikačných testov nukleových kyselín (NAATs) schválených a registrovaných Správou potravín a liečiv v USA (FDA) pre diagnostiku infekčných ochorení je dostupný na: https://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/ucm330711.htm.

4.1.1. Kvantitatívna PCR

Kvantitatívna PCR (qPCR) predstavuje modernú technológiu amplifikácie nukleových kyselín, ktorá umožňuje monitorovanie priebehu PCR reakcie v reálnom čase pomocou fluorescenčne značených sond alebo interkalačných farbív. Na rozdiel od klasickej PCR, pri ktorej je detekcia produktu možná až po ukončení amplifikácie, qPCR poskytuje údaje o množstve vzniknutých amplikónov počas každej cyklickej fázy a eliminuje potrebu post-PCR manipulácie (napr. gélová elektroforéza). Z toho dôvodu je táto metóda časovo výhodnejšia a menej náchylná na prípadnú kontamináciu.

V súčasnosti jedna z najpoužívanejších q-PCR technológií využíva typ sondy TaqMan, ktorá obsahuje fluorescenčnú farbičku na 5' konci (reportér) a na 3' konci (zhášač, častejšie sa používa výraz „*quencher*“). Pokiaľ sú tieto dve molekuly blízko pri sebe, teda keď je sonda ešte neporušená, žiadny fluorescenčný signál sa neobjaví, pretože signál z reportéra je okamžite pohltený quencherom. Počas PCR reakcie DNA polymeráza rozpozná sondu naviazanú na DNA a pri syntéze nového reťazca ju štiepi. Tým dôjde k fyzickému oddeleniu reportéra od quencheru, čím sa fluorescenčný signál uvoľní a stane sa detegovateľným. Tento signál sa meria po každom cykle PCR, pričom jeho intenzita priamo koreluje s množstvom vytvorenej DNA. Veľkou výhodou tejto metódy je, že nevyžaduje tzv. post-PCR analýzy, čím sa minimalizuje riziko kontaminácie. Navyše, výsledky môžu byť k dispozícii už do jednej hodiny od začiatku reakcie, čo výrazne urýchľuje diagnostiku.

V prípadoch, keď je genetický materiál patogéna vo forme RNA, je pred amplifikáciou nevyhnutná jej konverzia na komplementárnu DNA (cDNA). Tento krok sa realizuje pomocou enzýmu reverzná transkriptáza a označuje sa ako reverzná transkripcia. Kombinácia reverznej transkripcie s q-PCR je štandardnou metódou pri diagnostike RNA vírusov, ako sú napríklad SARS-CoV-2, HIV, či vírus chrípky.

Okrem TaqMan sond existujú aj iné metódy detekcie amplifikovaných produktov. Jednou z najpoužívanejších alternatív je SYBR Green, čo je fluorescenčné farbivo, ktoré sa nešpecificky viaže na dvojvláknovú DNA. Počas PCR sa viaže na každý novovzniknutý produkt a pri naviazaní na dvojvláknovú DNA začne emitovať fluorescenčný signál, ktorý je možné monitorovať počas každého cyklu reakcie. Výhodou metódy je jednoduchosť a nižšia cena. Nevýhodou je nižšia špecificita, preto TaqMan technológia predstavuje vhodnejšiu voľbu pre klinickú diagnostiku.

4.1.2. Multiplexová PCR

Multiplexová PCR predstavuje rozšírenie základnej PCR, pri ktorej sa do jednej reakčnej zmesi pridávajú primery a sondy pre viacero cieľových sekvencií. Táto stratégia

umožňuje súčasnú detekciu viacerých patogénov v jednej reakcii, čo výrazne šetrí čas, materiál a tým aj náklady spojené s diagnostikou.

Táto technika je obzvlášť užitočná v klinickej praxi, kde umožňuje tzv. syndromický prístup, teda testovanie skupiny patogénov spojených s rovnakou klinickou prezentáciou, napríklad:

- respiračné infekcie (napr. chrípka, RSV, SARS-CoV-2, adenovírusy),
- pohlavne prenosné ochorenia (napr. *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, HSV),
- gastrointestinálne infekcie, meningitídy, sepsy a pod.

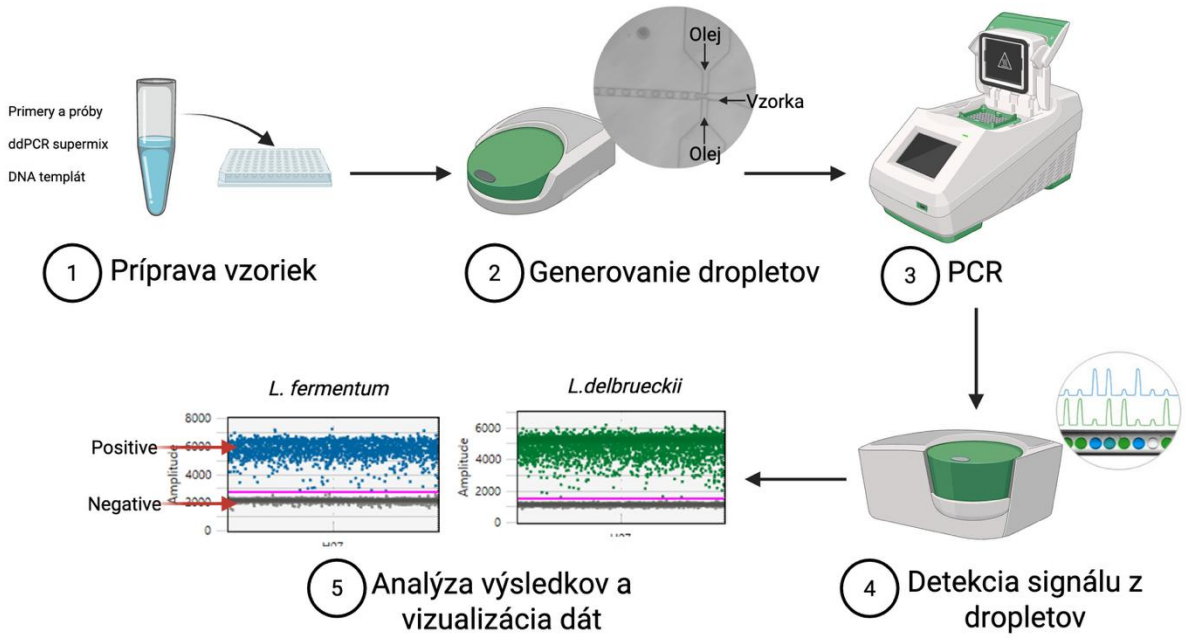
V súčasnosti je počet cieľov, ktoré možno v jednej reakcii spoľahlivo detegovať, limitovaný dostupnými fluorescenčnými farbivami, ktoré umožňujú rozlíšiť zvyčajne 3–4 ciele v jednej q-PCR reakcii. Napriek tomu existujú komerčne dostupné multiplexové panely schopné detegovať aj 12 a viac patogénov (napríklad QIAstat-Dx Gastrointestinal Panel dokáže naraz identifikovať až 24 enterických patogénov v stolici s citlivosťou 97,6 %), využívajúce pokročilé sondy, mikročipy alebo viacnásobné reakčné komory. Počas pandémie COVID-19 boli vo veľkej miere využívané rozsiahle multiplexové panely, ktoré umožňovali paralelnú detekciu viacerých vírusov (napr. SARS-CoV-2, chrípka, RSV a ďalšie respiračné patogény). Po odznení pandémie však došlo k výraznému posunu smerom k menším a cielenejším diagnostickým panelom. Takýto prístup je praktickejší a šetrnejší z hľadiska času aj financií a umožňuje rýchlejšiu a cielenejšiu diagnostiku u pacientov s typickou symptomatológiou. Výber menších, cielene zostavených diagnostických panelov zároveň znižuje riziko detekcie klinicky nevýznamných patogénov a zlepšuje interpretáciu výsledkov v kontexte konkrétneho klinického obrazu ochorenia.

4.1.3. Digitálna dropletová PCR

Digitálna dropletová PCR (ddPCR) predstavuje významný pokrok v oblasti molekulárnej diagnostiky. Základný princíp ddPCR spočíva v rozdelení PCR reakčnej zmesi na tisíce až milióny malých kvapiek (dropletov), z ktorých každá funguje ako samostatná PCR mikroreakcia. Každá kvapka môže (ale nemusí) obsahovať kópiu cieľovej sekvencie. Po PCR amplifikácii sa každá kvapka analyzuje individuálne na prítomnosť fluorescenčného signálu (obr. 7)

ddPCR nachádza čoraz širšie uplatnenie aj v klinickej mikrobiológii, avšak väčšina testov je v súčasnosti určená iba na výskumné účely. Jednou z najvýznamnejších oblastí je kvantifikácia vírusovej nálože. ddPCR sa využíva napríklad na detekciu HIV-1, vírusov hepatitídy B a C, CMV či SARS-CoV-2. Vďaka vysokej citlivosti je ddPCR vhodná na sledovanie efektivity antivírusovej liečby, hodnotenie reziduálnej infekcie alebo diagnostiku v skorých fázach ochorenia. ddPCR umožňuje aj citlivú a presnú identifikáciu

génov alebo konkrétnych mutácií v heterogénnych mikrobiálnych populáciách zodpovedných za rezistenciu. Potenciál tejto metódy sa tiež uplatňuje v prípadoch, keď je potrebné diagnostikovať infekcie z klinického materiálu s nízkou bakteriálnou náložou, napríklad *Mycobacterium tuberculosis* v extrapulmonálnych vzorkách alebo meningokoky, pneumokoky a *Haemophilus influenzae* v mozgovomiechovom moku.



Obr. 7: *Základný princíp ddPCR metódy*

4.2. Izotermálne amplifikačné metódy

Na rozdiel od klasickej PCR, ktorá si vyžaduje opakované zmeny teploty počas jednotlivých amplifikačných cyklov, izotermálne amplifikačné metódy umožňujú zmnožovanie nukleových kyselín pri konštantnej teplote. Tieto techniky nevyžadujú použitie termocykléra, čím sa výrazne znižujú technické a prístrojové nároky, skracuje sa čas analýzy a rozširujú sa možnosti ich využitia v diagnostike priamo na mieste poskytovania zdravotnej starostlivosti (*point-of-care testing*, POCT), najmä v podmienkach s obmedzenými zdrojmi, ako sú ambulancie, terénna medicína alebo rozvojové krajiny.

Medzi najznámejšie techniky izotermálnej amplifikácie, ktoré sa skúmajú alebo zavádzajú do klinickej praxe, patria:

- *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP),
- *recombinase polymerase amplification* (RPA),

- izotermická amplifikácia sekvencie nukleovej kyseliny (NASBA),
- amplifikácia závislá od helikázy (HDA).

Z izotermálnych amplifikačných metód sú v klinickej mikrobiológii najčastejšie využívané LAMP a HDA, ktoré sa vďaka svojej jednoduchosti, spoľahlivosti a vysokej citlivosti stali základom viacerých diagnostických systémov a komerčných testovacích súprav určených na diagnostiku infekčných ochorení.

Metóda RPA umožňuje veľmi rýchlu amplifikáciu už pri izbovej teplote, zatiaľ čo NASBA je špecializovaná na amplifikáciu RNA cieľových sekvencií. Hoci FDA-schválené testy pre tieto metódy zatiaľ nie sú veľmi rozšírené, ich diagnostický potenciál bol preukázaný napríklad pri detekcii RNA vírusov a *Streptococcus pneumoniae*.

4.2.1. Loop-mediated isothermal amplification

Princípom metódy je využitie enzýmu Bst DNA polymerázy (pôvodne z *Geobacillus stearothermophilus*), ktorý má schopnosť tzv. syntézy s vytláčaním reťazca, teda dokáže syntetizovať nový reťazec DNA tak, že vytláča pôvodné vlákno bez nutnosti predchádzajúcej denaturácie dvojvláknovej DNA.

Na rozdiel od klasickej PCR, ktorá využíva dvojicu primerov viažucich sa na komplementárne úseky DNA, metóda LAMP pracuje so štyrmi až šiestimi špecifickými primermi, ktoré rozpoznávajú šesť až osem cieľových oblastí v DNA sekvencii. Základnú zostavu tvoria dva vonkajšie a dva vnútorné primery, ktoré zabezpečujú samotný proces amplifikácie. Okrem nich sa často používajú aj tzv. slučkové primery (*loop primers*), ktoré významne urýchľujú priebeh reakcie a zároveň zvyšujú jej analytickú citlivosť.

Výsledkom je veľké množstvo DNA produktov so špecifickou štruktúrou pozostávajúcou z opakujúcich sa úsekov cieľovej sekvencie. LAMP je primárne navrhnutá tak, aby umožňovala jednoduchú vizualizáciu výsledku aj voľným okom, napríklad prostredníctvom zakalenia reakčnej zmesi v dôsledku tvorby pyrofosforečnanu horečnatého alebo zmeny farby pri použití pH-indikátorov. Moderné protokoly však často využívajú fluorescenčné farbivá (napr. SYBR Green, etídium bromid) na presnejšiu, citlivejšiu a kvantifikovateľnú detekciu amplifikácie.

Metóda je účinná pri detekcii DNA aj RNA vírusov (vrátane vírusov Dengue, Zika a SARS-CoV-2), ako aj pri diagnostike tuberkulózy. V prípade RNA patogénov sa pred samotnou amplifikáciou využíva reverzná transkripcia na syntézu komplementárnej DNA, pričom sa táto modifikácia označuje ako RT-LAMP.

Komerčné využitie LAMP sa v posledných rokoch výrazne rozšírilo a FDA-schválené testy sú dostupné napríklad na detekciu *Clostridioides (*pôvodne označované ako *Clostridium) difficile*, *Salmonella* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, streptokokov

skupiny A a B a *Bordetella pertussis*. Okrem identifikácie patogénov sa významná časť súčasného výskumu zameriava aj na využitie LAMP pri detekcii génov asociovaných s antimikrobiálnou rezistenciou.

4.2.2. Amplifikácia závislá od helikázy

HDA je izotermálna amplifikačná metóda**,** ktorá umožňuje amplifikáciu DNA bez potreby cyklických zmien teploty, podobne ako pri LAMP. Jej princíp je založený na napodobnení prirodzeného mechanizmu replikácie DNA v živých bunkách. Kľúčovým enzýmom je DNA helikáza, ktorá pri konštantnej reakčnej teplote (zvyčajne okolo 60 °C) rozrušuje vodíkové väzby medzi komplementárnymi vláknami DNA, čím zabezpečuje ich separáciu bez potreby tepelnej denaturácie. Tým sa eliminuje nutnosť používania vysokých teplôt, ktoré sú nevyhnutné pri klasickej PCR.

Po separácii komplementárnych vlákien DNA pôsobením helikázy sa na vzniknuté jednovláknové úseky naviažu špecifické primery, ktoré slúžia ako iniciačné miesta pre syntézu nových DNA reťazcov pomocou DNA polymerázy. Týmto mechanizmom dochádza k exponenciálnej amplifikácii cieľovej DNA pri konštantnej reakčnej teplote.

Výhodou HDA je jej kompatibilita s rôznymi detekčnými technológiami, vrátane kvalitatívnych aj kvantitatívnych fluorescenčných metód. Vďaka tomu môže byť realizovaná aj na prístrojoch určených pre qPCR, čo výrazne zvyšuje jej dostupnosť a flexibilitu v laboratórnej praxi. Zároveň sa HDA javí ako perspektívna metóda pre vývoj jednoduchých a prenosných diagnostických zariadení vhodných na terénne použitie a POCT.

V súčanosti sú dostupné FDA-schválené diagnostické testy pre detekciu *herpes simplex* vírusu typu 1 a 2, *Clostridioides difficile*, ako aj beta-hemolytických streptokokov skupín A a B.

4.3. Sekvenovanie a genomické prístupy

Sekvenovanie nukleových kyselín je analytická metóda, ktorá umožňuje určiť presné poradie nukleotidov v molekule DNA alebo RNA. Na rozdiel od amplifikačných metód, ktoré detegujú iba prítomnosť špecifických úsekov nukleových kyselín, sekvenovanie poskytuje komplexný prehľad o genetickej informácii genómu alebo jeho častí. Tým vytvára priestor nielen na presnú identifikáciu patogénov, ale aj na skúmanie ich epidemiologických súvislostí, charakterizáciu mechanizmov antimikrobiálnej rezistencie a virulenčných faktorov. V poslednom desaťročí sa sekvenovanie výrazne sprístupnilo vďaka rozvoju vysokopriepustných platforiem (sekvenovanie novej generácie, NGS), čím sa stalo neoddeliteľnou súčasťou klinickej mikrobiológie aj verejného zdravotníctva.

4.3.1. Sangerovo sekvenovanie

Sangerovo sekvenovanie, vyvinuté v 70. rokoch 20. storočia Frederickom Sangerom, patrí medzi základné metódy určovania nukleotidovej sekvencie DNA. Napriek rozvoju vysokopriepustných sekvenačných technológií je naďalej považované za zlatý štandard pre analýzu krátkych úsekov DNA a predstavuje spoľahlivú metódu na validáciu výsledkov získaných inými molekulárno-biologickými technikami.

Reakcia je založená na princípe podobnom PCR: DNA polymeráza syntetizuje nové vlákno DNA na základe templátovej molekuly. Na rozdiel od bežnej PCR sa však okrem klasických deoxynukleotidov (dATP, dTTP, dCTP a dGTP) do reakčnej zmesi pridávajú aj dideoxynukleotidy (ddNTP), ktoré postrádajú hydroxylovú skupinu na 3' uhlíku ribózy. Táto skupina je nevyhnutná pre naviazanie ďalšieho nukleotidu, a preto po inkorporácii ddNTP dôjde k ukončeniu syntézy reťazca. Každý zo štyroch typov ddNTP je označený špecifickým fluorescenčným farbivom, ktoré po excitácii laserom emituje svetlo pri odlišnej vlnovej dĺžke. Výsledné DNA fragmenty rôznej dĺžky sa následne separujú pomocou kapilárnej elektroforézy, kde detektor sníma fluorescenčný signál a prevádza ho do sekvenčného záznamu (elektroferogramu). Poradie vzniknutých fragmentov tak zodpovedá presnému nukleotidovému zloženiu templátovej DNA.

V súčasnosti sa Sangerovo sekvenovanie využíva najmä na analýzu jednotlivých génov a vybraných génových oblastí, na konfirmačnú detekciu mutácií identifikovaných pomocou PCR, ako aj na identifikáciu patogénov pri nejasnej etiológii infekcie, napríklad sekvenovaním génu 16S rRNA u baktérií alebo ITS oblastí u húb. V porovnaní s NGS technológiami má síce výrazne obmedzenú priepustnosť a rozsah využitia, jeho hlavnými výhodami však zostávajú časová a ekonomická nenáročnosť, ako aj vysoká presnosť výsledkov.

4.3.2. Sekvenovanie novej generácie

NGS predstavuje prelomový prístup v analýze nukleových kyselín, ktorý umožňuje paralelné čítanie miliónov až miliárd fragmentov DNA alebo RNA. V kontexte infekčných ochorení umožňuje nielen identifikáciu pôvodcov infekcie, ale súčasne aj detekciu génov kódujúcich rezistenciu, subtypizáciu kmeňov či analýzu kompletných mikrobiálnych spoločenstiev (napr. črevný mikrobióm).

4.3.2.1. Sekvenovanie syntézou

Sekvenovanie syntézou patrí medzi najrozšírenejšie NGS technológie druhej generácie, ktoré výrazne urýchlili získavanie sekvenčných údajov a zároveň znížili náklady na analýzu. V klinickej mikrobiológii sa stalo štandardom pre genómové analýzy baktérií, vírusov či húb.

Hoci princíp nadväzuje na klasickú Sangerovu metódu, technické prevedenie sa výrazne líši. DNA sa najprv rozštiepi na krátke fragmenty (približne 50–300 báz), ku ktorým sa pripoja známe sekvencie (tzv. adaptéry). Tieto adaptéry slúžia ako väzobné miesta pre primery prichytené na povrchu tzv. *flow cell* (špeciálne upraveného sklíčka s mikroskopickými kanálikmi). Následne dochádza k amplifikácii fragmentov formou tzv. mostíkovej PCR, pri ktorej vznikajú klastre identických molekúl DNA. Každý klaster predstavuje kópiu jedného pôvodného fragmentu, pričom v jednom kanáliku môže byť prítomných niekoľko miliónov takýchto klastrov. Počas sekvenovania sa na *flow cell* postupne pridávajú nukleotidy, ktoré sú označené fluorescenčnými farbivami. V každom cykle sa k rastúcemu reťazcu DNA pripojí len jeden nukleotid, ktorého farba je následne zachytená špeciálnym detekčným systémom. Po zaznamenaní signálu sa fluorescenčné značenie aj blokujúca chemická skupina odstránia, čím sa umožní pripojenie ďalšieho nukleotidu v nasledujúcom cykle. Tento proces sa opakuje miliónkrát súčasne vo veľkom počte kanálikov (obr. 8). Vďaka tomu možno naraz čítať milióny fragmentov DNA, čo umožňuje získať úplnú sekvenciu bakteriálneho genómu v priebehu jedného dňa. Dôležitou súčasťou je aj bioinformatická analýza. Sekvenované úseky (tzv. *reads,* čítania) sú krátke a je potrebné ich následne poskladať buď na základe prekrývajúcich sa oblastí alebo porovnaním so známou referenčnou sekvenciou.

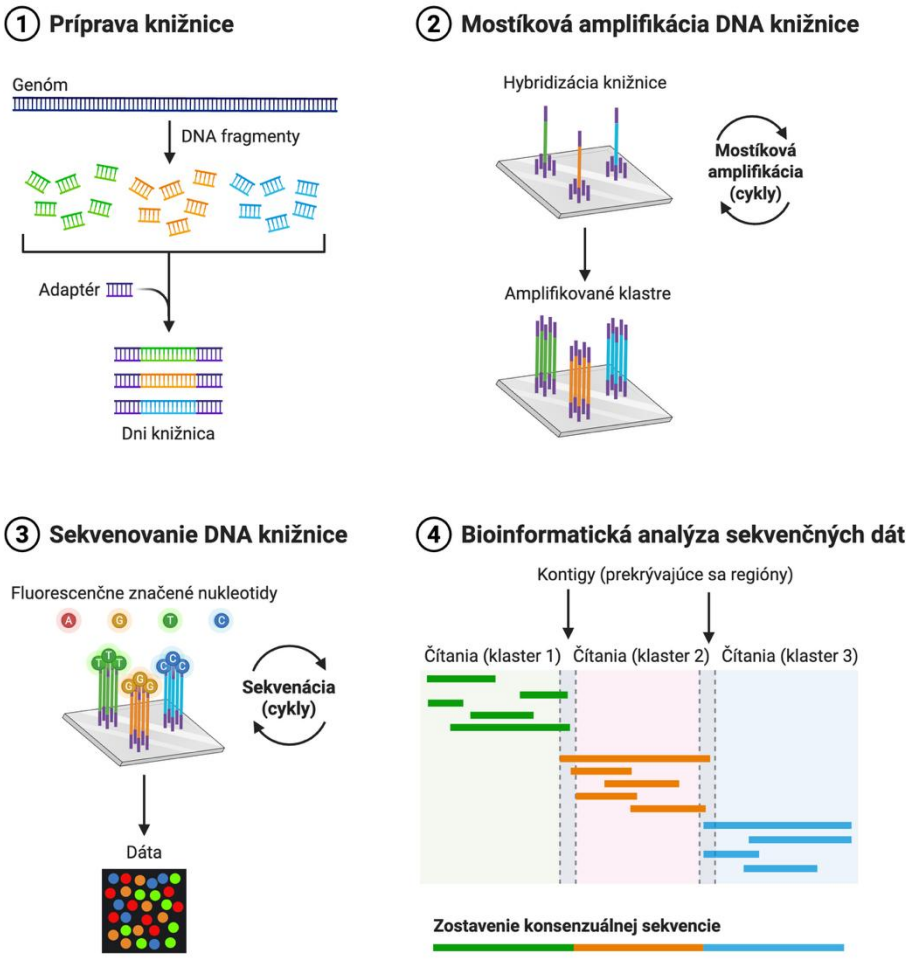
Sekvenovanie syntézou sa v klinickej mikrobiológii využíva predovšetkým v dvoch základných formách: celogenómové sekvenovanie (WGS) a cielené sekvenovanie (tNGS). Zatiaľ čo WGS poskytuje komplexný prehľad o celom genóme mikroorganizmu, tNGS je zamerané na analýzu vybraných génov, najčastejšie asociovaných s antimikrobiálnou rezistenciou, virulenciou alebo druhovou identifikáciou. Tento prístup je výhodný z hľadiska nižších nákladov, kratšieho času analýzy a jednoduchšej interpretácie výsledkov v diagnostickej praxi.

<u>K hlavným klinickým aplikáciám WGS patria:</u>

A) **Identifikácia nových alebo atypických patogénov** - pri infekciách nejasnej etiológie umožňuje WGS taxonomickú identifikáciu izolovaných mikroorganizmov na úrovni druhu, poddruhu alebo kmeňa. Vďaka detailnej analýze celého genómu je možné odhaliť aj nové alebo atypické druhy, genetické varianty či rekombinantné formy patogénov, ktoré by konvenčnými diagnostickými metódami mohli zostať neidentifikované alebo nesprávne klasifikované.

B) **Predikcia antimikrobiálnej rezistencie** - WGS predstavuje komplexný nástroj na detekciu genetických determinantov antimikrobiálnej rezistencie. Umožňuje identifikovať známe gény kódujúce rezistenciu (napr. *bla*KPC u enterobaktérií, *ERG11* u *Candida auris*) alebo konkrétne mutácie v cieľových génoch spojené s rezistenciou (napr. mutácie v *rpoB* u *Mycobacterium tuberculosis*, spojené s rezistenciou na rifampicín). Treba však zdôrazniť, že detekcia známych

rezistentných génov alebo mutácií nie je výlučnou doménou WGS, keďže mnohé z nich je možné cielene odhaliť aj pomocou PCR alebo iných molekulárno-biologických metód. WGS však poskytuje komplexný genómový prehľad, a tým umožňuje súčasné zachytenie všetkých známych rezistentných determinantov v jednom kroku. Genotypová predikcia rezistencie na základe detekcie génov a mutácií môže v niektorých prípadoch nahradiť fenotypové testovanie citlivosti, avšak nie všetky detegované mutácie majú jednoznačný klinický význam. Ich interpretácia si vyžaduje opatrnosť a v mnohých prípadoch je na potvrdenie klinickej relevancie potrebné fenotypové stanovenie citlivosti alebo funkčné štúdie.



Obr. 8: *Princíp sekvenovania syntézou*

Významnou výhodou WGS je schopnosť identifikovať aj nové, doposiaľ nepopísané mutácie asociované s rezistenciou, ktoré nie sú detegované cielenými molekulárnymi metódami. Príkladom klinického využitia WGS v tejto oblasti je

katalóg mutácií *Mycobacterium tuberculosis* a ich význam pre rezistenciu, publikovaný WHO (https://www.who.int/publications/i/item/9789240082410), ktorý slúži ako štandardizovaný referenčný nástroj pre interpretáciu genetických variantov spojených s rezistenciou voči antituberkulotikám.

C) **Molekulárna epidemiológia** - WGS sa v poslednom desaťročí stalo kľúčovým nástrojom pre epidemiologickú typizáciu mikroorganizmov, najmä v prípadoch nozokomiálnych nákaz, komunitných epidémií a zoonotických prenosov. Vďaka vysokej rozlišovacej schopnosti umožňuje porovnať genómy izolátov získaných od jednotlivých pacientov. Výsledkom je identifikácia geneticky príbuzných izolátov (tzv. klastrov) a rekonštrukcia prenosových reťazcov medzi pacientmi. Na základe týchto informácií možno cielene implementovať opatrenia v oblasti verejného zdravia, zamerané na prerušenie prenosu a prevenciu šírenia infekcie.

D) **Detekcia virulenčných faktorov** - pomocou WGS možno identifikovať gény spojené so zvýšenou patogenitou mikroorganizmov, ako sú napríklad toxíny, adhezíny, invazíny alebo komponenty sekrečných systémov. Tieto informácie môžu prispieť k odhadu klinickej závažnosti infekcie, predikcii jej priebehu, ako aj k optimalizácii terapeutického prístupu.

4.3.2.2. Sekvenovanie s dlhým čítaním (nanopórové sekvenovanie)

Nanopórové sekvenovanie predstavuje NGS technológiu tretej generácie, ktorá umožňuje priame čítanie nukleotidovej sekvencie jednotlivých molekúl DNA alebo RNA v reálnom čase, bez potreby amplifikácie alebo syntézy komplementárneho reťazca. Základom tejto metódy je prechod nukleovej kyseliny cez proteínový kanál zabudovaný do membrány (nanopór). Počas translokácie jednotlivých nukleotidov cez nanopór dochádza k charakteristickým zmenám iónového prúdu, ktoré sú detegované a algoritmicky interpretované ako konkrétna sekvencia báz.

Táto technológia umožňuje čítanie dlhých fragmentov, často v rozsahu desiatok až stoviek kilobáz, čo ju predurčuje na účely *de novo* sekvenovania genómov, detekciu štrukturálnych variantov (napr. veľké delécie, inverzie, translokácie), či presnú charakterizáciu mobilných genetických elementov a repetitívnych sekvencií. Dôležitou výhodou je možnosť priameho sekvenovania RNA molekúl (tzv. *direct RNA sequencing*), ako aj detekcie epigenetických modifikácií (napr. metylácia cytozínu).

Rovnako ako technológie sekvenovania syntézou, aj nanopórové platformy (napr. MinION, GridION, PromethION) umožňujú realizáciu prístupov WGS a tNGS. Ich výhodou je vysoká flexibilita, nižšie nároky na laboratórnu infraštruktúru a možnosť použitia v terénnych podmienkach, čo ich robí mimoriadne vhodnými pre epidemiologické štúdie, sledovanie prenosu infekcií a detekciu rezistencie v reálnom čase (tab. 9). Vďaka tomu

našli uplatnenie pri rýchlej diagnostike počas epidémií, ako napr. pri COVID-19 alebo počas výskytu Eboly, ale aj pri monitorovaní nozokomiálnych nákaz.

Tab. 9 *Porovnanie sekvenovania syntézou a nanopórového sekvenovania v klinickej mikrobiológii*

Parameter	Sekvenovanie syntézou	Nanopórové sekvenovanie
Princíp	Sekvenovanie pomocou inkorporácie fluorescenčne značených nukleotidov.	Priamy priechod molekuly DNA alebo RNA nanopórom a detekcia zmien iónového prúdu.
Dĺžka čítania	Krátke čítania (zvyčajne 50–300 bp)	Dlhé čítania (až desiatky kb, v niektorých prípadoch >100 kb)
Presnosť čítania	Vysoká (chybovosť <1 %)	Nižšia (pôvodne >5 %, no zlepšuje sa pri konsenzuálnom čítaní)
Časová náročnosť	1–2 dni (vrátane prípravy knižnice a sekvenovania)	Možnosť výsledku do niekoľkých hodín
Náročnosť prípravy vzorky	Vyžaduje fragmentáciu DNA, ligáciu adaptérov a amplifikáciu	Jednoduchá príprava knižnice bez PCR (tzv. *PCR-free workflow*)
Typy sekvenovaných molekúl	Primárne DNA, po reverznej transkripcii aj RNA	DNA aj RNA (možné aj priame RNA sekvenovanie)
Výhody	Vysoká presnosť, vhodné pre detekciu mutácií, dobre štandardizované platformy	Rýchlosť, dlhé čítania, možnosť priameho čítania RNA, prenosnosť (napr. MinION)
Nevýhody	Obmedzenia pri analýze repetitívnych oblastí, fúznych génov alebo plazmidov	Vyššia chybovosť jednotlivých čítaní
Klinické využitie	Detekcia mutácií, genotypizácia, metagenomika, epidemiologické štúdie	Detekcia mutácií, genotypizácia, priame sekvenovanie z klinického materiálu

Okrem WGS a tNGS sa v súčasnosti pozornosť zameriava na metagenomické analýzy.

4.3.2.3. Metagenomika

Metagenomika (mNGS) predstavuje moderný molekulárno-genetický prístup, ktorý umožňuje analýzu kompletného genetického materiálu (DNA alebo RNA) prítomného v klinickej vzorke, a to bez potreby predchádzajúcej kultivácie alebo cielenej amplifikácie vybraných genetických oblastí.

Klinické aplikácie zahŕňajú najmä:

- identifikáciu patogénov neznámeho pôvodu – napr. pri meningitídach, encefalitídach alebo sepsách s negatívnou kultiváciou,
- detekciu polymikrobiálnych infekcií,
- identifikáciu ťažko kultivovateľných alebo nekultivovateľných mikroorganizmov (napr. *Treponema pallidum*, niektoré vírusy, intracelulárne baktérie),
- analýzu mikrobiómu – najmä pri podozrení na dysbiózu v GIT, dýchacom trakte alebo urogenitálnom systéme,
- detekciu génov antimikrobiálnej rezistencie – teda tzv. rezistómu, vrátane plazmidovo prenášaných génov (napr. *blaKPC*, *blaNDM*, *mecA*) alebo mutácií (napr. *rpoB* u *Mycobacterium tuberculosis*).

Napriek vysokému diagnostickému potenciálu prináša metagenomické sekvenovanie (mNGS) aj viaceré limitácie, ktoré je nevyhnutné zohľadniť pri jeho klinickej interpretácii. Jedným z hlavných obmedzení je skutočnosť, že metóda nedokáže spoľahlivo rozlíšiť, či detegovaný mikroorganizmus predstavuje aktívneho pôvodcu infekcie alebo ide iba o prítomnosť reziduálnej DNA/RNA po prekonanej infekcii, prípadne o nepatogénnu kolonizáciu. Tento fakt môže viesť k nesprávnej interpretácii nálezu, najmä pri polymikrobiálnych výsledkoch alebo u kolonizovaných pacientov.

Ďalšou výzvou je spracovanie rozsiahleho množstva sekvenačných dát, ktoré si vyžaduje pokročilé bioinformatické nástroje a odborné znalosti pri interpretácii. Bez primeranej analýzy môže dôjsť k nesprávnemu určeniu patogénu alebo jeho rezistencie, čo znižuje klinickú využiteľnosť výsledku.

Technologické a ekonomické faktory predstavujú ďalšie významné prekážky širšej implementácie mNGS do rutinného diagnostického procesu. Napriek postupnému poklesu cien sekvenačných technológií zostávajú metagenomické analýzy finančne náročnejšie v porovnaní s cielenými PCR testami alebo klasickými kultivačnými metódami. Okrem toho môže byť výsledok mNGS falošne negatívny aj pri prítomnosti patogénu, ak je jeho genetický materiál vo vzorke zastúpený len v nízkej koncentrácii, čo limituje citlivosť vyšetrenia.

Riziko kontaminácie, či už z prostredia, kože pacienta alebo použitých reagencií, predstavuje ďalší významný zdroj skreslenia výsledkov a môže viesť k falošne pozitívnym nálezom. Napriek dostupnosti komerčných metagenomických testov je preto úloha mNGS v súčasnosti prevažne doplnková, keďže zatiaľ neexistujú jednotné diagnostické algoritmy ani štandardizované postupy pre jej rutinné využitie v klinickej praxi (tab. 10).

Tab. 10: *Príklady komerčne dostupných metagenomických testov využívaných v klinickej mikrobiológii*

Názov testu	Typ vzorky	Detegované patogény
Karius Test®	Plazma (sérum)	>1000 (baktérie, vírusy, huby, parazity)
UCSF CSF mNGS	Likvor	Baktérie, vírusy, huby, parazity
Galileo Pathogen Solution	Plazma, BAL, likvor, moč a ďalšie	Baktérie, vírusy, huby, parazity
IDbyDNA Explify Platform	Respiračné vzorky, likvor, stolica	Respiračné patogény, enteropatógeny, CNS patogény

4.4. Využitie molekulárnych metód v POCT

POCT (*Point-of-Care Testing*) predstavuje prístup, pri ktorom sa biologický materiál vyšetruje v mieste starostlivosti o pacienta, teda priamo v ambulancii, na lôžku či v teréne. Výsledok je dostupný okamžite alebo v priebehu niekoľkých desiatok minút, čo umožňuje iniciáciu cielenej liečby a prípadne vylúčenie infekčnej etiológie v krátkom čase. Vďaka plne automatizovaným, kompaktným a prenosným systémom využívajúcim jednorazové kazety, mikročipy alebo mikrofluidické riešenia je celý diagnostický cyklus (extrakcia, amplifikácia, detekcia) uzavretý a bezpečný, s minimálnym rizikom kontaminácie. Tieto vlastnosti tiež umožňujú využitie týchto technológií priamo v teréne, čo je dôležité najmä v rozvojových krajinách. V kontexte infekčných ochorení má takýto prístup zásadný význam nielen v prevencii empirického podávania antibiotík v prípadoch, kde nie je indikovaná antibiotická liečba, čím sa znižuje riziko rozvoja antimikrobiálnej rezistencie, ale aj v obmedzení prenosu infekcií prostredníctvom rýchlej izolácie pacientov.

Príklady POCT platforiem:

A) ***GeneXpert® System*** **(Cepheid) -** Tento systém patrí medzi najrozšírenejšie molekulárne POCT platformy. Využíva technológiu qPCR, ktorá je integrovaná do jednorazovej kazety obsahujúcej všetky potrebné reagencie.

V klinickej mikrobiológii sa platforma Xpert využíva na detekciu viacerých patogénov priamo z klinického materiálu. Medzi najznámejšie aplikácie patrí Xpert MTB/RIF Ultra, ktorý slúži na priamy dôkaz *Mycobacterium tuberculosis* a zároveň deteguje mutácie asociované s rezistenciou voči rifampicínu. Ďalej sú dostupné kazety Xpert Xpress SARS-CoV-2 pre detekciu koronavírusu SARS-CoV-2, Xpert Xpress Flu/RSV na súčasné vyšetrenie vírusov chrípky A/B a respiračného syncyciálneho vírusu, ako aj Xpert CT/NG určený na detekciu *Chlamydia trachomatis* a *Neisseria gonorrhoeae*.

B) **Abbott ID NOW™** - Táto platforma predstavuje prenosné molekulárne zariadenie na princípe izotermálnej amplifikácie (kapitola 4.2). Na rozdiel od qPCR však môže mať mierne nižšiu citlivosť, čo je potrebné zohľadniť pri interpretácii negatívnych výsledkov v prípade vysokej klinickej pravdepodobnosti ochorenia.

Medzi schválené testy pre túto platformu patria: SARS-CoV-2, vírus chrípky A/B**,** respiračný syncyciálny vírus a *Streptococcus pyogenes* skupiny A.

C) ***BioFire*® *FilmArray*® *System*** - plne automatizovaná molekulárna platforma na princípe multiplexovej PCR (kapitola 4.1.2) určená na syndrómovo orientovanú diagnostiku infekčných ochorení priamo na mieste starostlivosti alebo v laboratóriu s minimálnymi požiadavkami na obsluhu. Vďaka schopnosti poskytnúť komplexné výsledky je mimoriadne cenným nástrojom pri diferenciálnej diagnostike nejasných febrilných stavov, v urgentnej medicíne, intenzívnej starostlivosti a v pediatrii. K jeho výhodám patrí aj vysoká citlivosť a špecifickosť, avšak limitáciou zostáva vyššia cena na test a komplikovaná interpretácia výsledkov v prípade pozitívneho nálezu viacerých patogénov.

V súčasnosti sú schválené nasledujúce panelové testy**:**

- Respiračný panel: vírus chrípky A/B, SARS-CoV-2, respiračný syncyciálny vírus, rinovírusy, adenovírusy, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*.
- Gastrointestinálny panel: identifikácia baktérií (napr. *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.), vírusov (napr. norovírus) a parazitov.
- Panel pre infekcie CNS: zahŕňa baktérie (*Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*), vírusy (napr. HSV, enterovírusy) a huby (*Cryptococcus neoformans*).
- Panel na infekcie krvného obehu: umožňuje detekciu patogénov pri sepsách spolu s génmi rezistencie (napr. *blaKPC*, *mecA*).

D) ***Cue Health System*** - pozostáva z malého prenosného analyzátora, jednorazových kaziet obsahujúcich reagencie a softvéru pre zobrazovanie výsledkov. Vyšetrenie prebieha bez potreby laboratórneho spracovania vzorky, čím sa výrazne skracuje čas od odberu po výsledok (zvyčajne do 20 minút). Doposiaľ bola táto platforma využitá iba na diagnostiku SARS-CoV-2.

E) **Nanopórové sekvenovanie (primárne technológie spoločnosti *Oxford Nanopore Technologies*)** - jednou z najnovších technológií využiteľných aj v oblasti POCT je nanopórové sekvenovanie (kapitola 4.3.2.2.). Hlavnou výhodou v kontexte POCT je kompaktnosť a vysoká mobilita zariadení, pričom napríklad sekvenátor MinION váži menej ako 100 gramov a je možné ho priamo pripojiť k notebooku alebo tabletu prostredníctvom USB rozhrania. Táto technológia umožňuje rýchlu a presnú identifikáciu patogénov, pričom zároveň poskytuje

informácie o prítomnosti génov asociovaných s antimikrobiálnou rezistenciou, virulenčných faktoroch a genetických variantoch významných z hľadiska patogenity a epidemiologických súvislostí.

V klinickej praxi bolo nanopórové sekvenovanie úspešne využité napríklad pri sledovaní šírenia vírusových epidémií, v diagnostike tuberkulózy, pri rýchlej detekcii pôvodcov mykotických infekcií, ako aj v diagnostike sepsy priamo z krvi pacienta.

Hoci táto technológia zatiaľ nie je rutinnou súčasťou v mikrobiologických laboratóriách, očakáva sa, že vďaka znižujúcim sa technickým nárokom spracovania sekvenačných dát bude hrať v najbližších rokoch významnú úlohu v rozvoji decentralizovanej diagnostiky.

Zhrnutie kapitoly

Molekulárne diagnostické metódy predstavujú základný pilier súčasnej klinickej mikrobiológie, nakoľko umožňujú rýchlu, vysoko špecifickú a citlivú detekciu nukleových kyselín patogénov, vrátane ťažko kultivovateľných alebo pomaly rastúcich mikroorganizmov. PCR a jej modifikácie vytvorili platformu pre rutinnú diagnostiku vírusových, bakteriálnych a mykotických infekcií, vrátane detekcie génov antimikrobiálnej rezistencie. Izotermálne amplifikačné techniky rozširujú možnosti rýchlej diagnostiky aj mimo laboratórnych podmienok, napríklad v ambulanciách alebo teréne. Sekvenačné technológie umožňujú detailnú analýzu genómov patogénov, pričom výsledky môžu byť využité za účelom predikcie rezistencie, charakterizácie ohnísk nákazy a virulenčných faktorov. Metagenomické prístupy predstavujú perspektívny nástroj pre diagnostiku infekcií nejasnej etiológie. Naprieč týmito platformami je spoločným trendom miniaturizácia a automatizácia pracovných krokov, čo zásadne skracuje časovú náročnosť a minimalizuje riziká spojené s manipuláciou s klinickým materiálom.

Kontrolné otázky (iba jedna správna odpoveď)

1. Aký je základný diagnostický prínos PCR v porovnaní s kultiváciou?
A. Poskytuje rýchly a vysoko špecifický dôkaz prítomnosti patogénu.
B. Umožňuje testovať len živé mikroorganizmy.
C. Umožňuje priamu fenotypovú analýzu rezistencie.
D. Je použiteľná len na vírusy.

2. V ktorom prípade je nevyhnutné zaradiť pred PCR krok reverznej transkripcie?
A. pri detekcii DNA vírusov
B. pri detekcii RNA patogénov
C. pri detekcii bakteriálnych toxínov
D. pri analýze mutácií v genómovej DNA

3. Ktoré obmedzenie najvýznamnejšie limituje interpretáciu výsledkov metagenomického sekvenovania v rutinnej klinickej diagnostike?

A. neschopnosť metódy detegovať vírusové genómy

B. neschopnosť zachytiť polymikrobiálne spektrum patogénov

C. úplná neschopnosť identifikovať gény antibiotickej rezistencie

D. nemožnosť jednoznačne odlíšiť kolonizáciu od aktívnej infekcie

4. Aký metodický princíp je charakteristický pre digitálnu dropletovú PCR?

A. následná analýza amplifikovaných fragmentov pomocou sekvenovania

B. amplifikácia nukleových kyselín pri konštantnej teplote bez termocyklácie

C.rozdelenie PCR reakčnej zmesi na veľké množstvo jednotlivých mikroreakcií v emulzných kvapkách

D. detekcia amplifikovaných produktov pomocou agarózovej gélovej elektroforézy

5. Prečo má qPCR oproti klasickej PCR vyššiu diagnostickú výpovednú hodnotu?

A. Je menej náchylná na inhibíciu.

B. Umožňuje simultánnu detekciu aj kvantifikáciu.

C. Nevyžaduje kontroly.

D. Eliminuje kontamináciu.

6. Aký je hlavný klinický prínos celogenómového sekvenovania?

A. súčasná identifikácia patogénu, rezistencie a prenosových reťazcov

B. len identifikácia druhu

C. rýchlejšie výsledky než qPCR

D. nahradenie všetkých fenotypových metód

7. V ktorom prípade je nevyhnutné zaradiť pred PCR krok reverznej transkripcie?

A. pri detekcii kvasiniek

B. pri detekcii RNA vírusov

C. pri detekcii bakteriálnych toxínov

D. pri analýze mutácií v genómovej DNA

8. U pacienta s klinickým obrazom akútnej bakteriálnej meningitídy je z likvoru pomocou PCR metódy detegovaná *Neisseria meningitidis*, avšak kultivačné vyšetrenie ostáva negatívne aj po 48 hodinách inkubácie. Ktoré z nasledujúcich vysvetlení je najpravdepodobnejšie?

A. Použité primery v PCR reakcii boli nesprávne navrhnuté.

B. Došlo ku kontaminácii reagenčných súprav bakteriálnou DNA.

C. PCR metóda má nízku analytickú senzitivitu.

D. Pacient bol pred odberom likvoru liečený antibiotikami.

9. Ktoré tvrdenie správne charakterizuje izotermálne amplifikačné metódy?

A. Vyžadujú presnú termocykláciu.

B. Sú použiteľné len na DNA vírusy.

C. Prebiehajú pri konštantnej teplote.

D. Sú pomalšie ako klasická PCR.

10. Ktorá vlastnosť najlepšie charakterizuje molekulárne platformy určené pre testovanie *point-of-care*?

A. Vyžadujú si rozsiahlu laboratórnu infraštruktúru.

B. Sú určené výlučne na výskumné účely.

C. Poskytujú rýchly výsledok priamo v mieste starostlivosti o pacienta.

D. Neumožňujú detekciu rezistencie.

Správne odpovede na strane 84.

5. IMUNOLOGICKÉ METÓDY

Imunologické metódy sú založené na vysoko špecifickej väzbe medzi antigénom a protilátkou, ktorá umožňuje detekciu samotného mikroorganizmu alebo hodnotenie imunitnej odpovede hostiteľa na infekciu. Táto interakcia tvorí základ širokého spektra diagnostických testov využívaných v klinickej mikrobiológii. V klinickej mikrobiológii sa tieto testy používajú najmä na:

- **priamu detekciu antigénov patogénov** vo vzorke pacienta, napríklad povrchových proteínov vírusov, kapsulárnych polysacharidov, bakteriálnych toxínov alebo iných špecifických štruktúr mikroorganizmov,
- **nepriamu detekciu prítomnosti patogénu prostredníctvom dôkazu špecifických protilátok** (najčastejšie tried IgM, IgG, prípadne IgA), ktoré sú produkované imunitným systémom pacienta v odpovedi na infekciu.

5.1. Aglutinačné testy

Aglutinácia je imunologická reakcia medzi antigénom a protilátkou, pri ktorej dochádza k tvorbe viditeľných zhlukov, tzv. aglutinátov. Táto reakcia prebieha medzi viacmolekulovými antigénmi (napr. baktériami, erytrocytmi, latexovými časticami) a špecifickými imunoglobulínmi, najčastejšie triedy IgM, ktoré vďaka svojej pentamérnej štruktúre dokážu viazať viacero antigénov súčasne. Táto štruktúra umožňuje protilátke krížovo prepojiť viaceré antigénové štruktúry, čo následne vedie k tvorbe aglutinátov.

Z imunologického hľadiska má aglutinácia význam aj *in vivo*, kde prispieva k obmedzeniu mobility a infekčnosti mikroorganizmov. Väzba protilátok, ktoré sú často rozmerovo väčšie než bakteriálny bičík alebo vírusová častica, môže mechanicky narušiť pohyb patogénu a jeho schopnosť adherovať k cieľovým bunkám alebo do nich prenikať. Zhluky mikroorganizmov vzniknuté pôsobením protilátok sú zároveň efektívnejšie rozpoznávané a rýchlejšie fagocytované bunkami imunitného systému. Napriek tomuto fyziologickému významu sa v klinickej mikrobiológii využíva predovšetkým aglutinácia *in vitro* ako jednoduchý, rýchly a praktický nástroj laboratórnej diagnostiky.

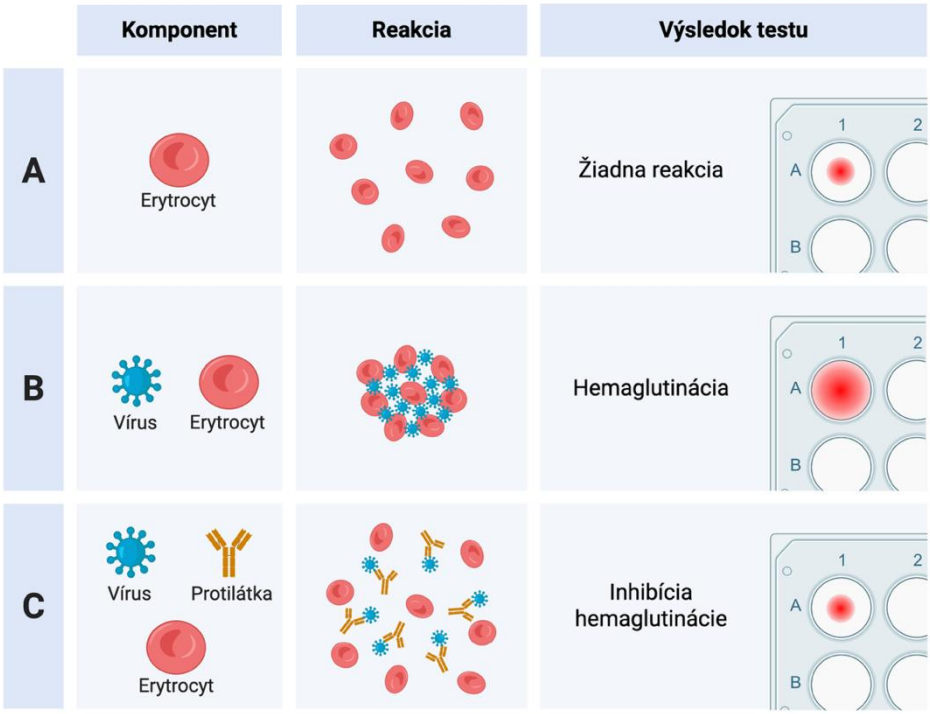
Typy aglutinačných testov:

A) **Priama aglutinácia** - je diagnostická metóda, pri ktorej protilátky reagujú s prirodzene sa vyskytujúcimi antigénmi na povrchu nerozpustných častíc, ako sú napríklad baktérie alebo erytrocyty. Antigén je teda inherentnou súčasťou pevnej fázy a nevyžaduje žiadne ďalšie väzby na nosiče.

Typickým príkladom je bakteriálna aglutinácia využívaná pri Wrightovom teste na diagnostiku brucelózy a Widalovom teste na diagnostiku brušného týfusu.

V týchto testoch sa ako antigény používajú usmrtené alebo inaktivované baktérie. Sérum získané od pacienta sa zriedi a následne sa k nemu pridá definované množstvo antigénovej suspenzie. Prítomnosť aglutinujúcich protilátok sa prejaví tvorbou viditeľných zhlukov, čo signalizuje pozitívnu reakciu.

K ďalším príkladom priamej aglutinácie patrí hemaglutinácia, pri ktorej sa využíva schopnosť niektorých vírusových a bakteriálnych antigénov viazať sa na povrch erytrocytov a spôsobiť ich aglutináciu, resp. schopnosť protilátok túto reakciu sprostredkovať alebo inhibovať (obr. 9). V praxi sa používajú testy na princípe nepriamej (pasívnej) hemaglutinácie a inhibície hemaglutinácie. Pri nepriamej hemaglutinácii sú erytrocyty chemicky upravené a pokryté purifikovanými antigénmi mikroorganizmov. Ak sú v sére pacienta prítomné špecifické protilátky, viažu sa na tieto antigény a spôsobujú aglutináciu erytrocytov. Príkladom sú testy na prítomnosť *Francisella tularensis*, *Mycoplasma pneumoniae* alebo *Treponema pallidum*. Inhibícia hemaglutinácie sa využíva pri víruse chrípky A/B, osýpok, rubeoly alebo príušníc. Tieto vírusy prirodzene spôsobujú hemaglutináciu, ale prítomnosť špecifických protilátok v sére pacienta túto schopnosť zablokuje. Miera inhibície tak indikuje hladinu protilátok a môže byť použitá na posúdenie imunity alebo diagnózu prebiehajúcej či prekonanej infekcie.



Obr. 9: *Základné typy reakcií pri hemaglutinačnom teste*

B) **Nepriama (pasívna) aglutinácia** - je modifikáciou priamej aglutinácie, pri ktorej antigén nie je prirodzenou súčasťou častice, ale je na ňu umelo naviazaný. Najčastejšie sa ako nosiče používajú erytrocyty (tzv. senzibilizované erytrocyty) alebo latexové častice, ktoré sú pokryté purifikovaným antigénom alebo špecifickou protilátkou.

V klinickej mikrobiológii sa nepriama aglutinácia, obzvlášť vo forme latexovej aglutinácie, často využíva na rýchlu detekciu mikrobiálnych antigénov priamo v klinickom materiáli. Typickým príkladom je diagnostika bakteriálnych meningitíd, pri ktorej sa testuje mozgovomiechový mok na prítomnosť polysacharidových kapsulárnych antigénov významných patogénov, ako sú *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* (séroskupina K1) a *Streptococcus agalactiae*. Pozitívny výsledok testu je charakterizovaný viditeľnou aglutináciou latexových častíc pokrytých protilátkami, ktorá nastáva v prítomnosti špecifického antigénu.

Okrem likvoru sa táto metóda využíva aj pri detekcii rotavírusov v stolici, pri sérologickej typizácii kmeňov *Neisseria gonorrhoeae*, ako aj na dôkaz *Staphylococcus aureus* prostredníctvom identifikácie proteínu A alebo klonálne špecifických antigénov. Vďaka svojej rýchlosti, jednoduchej realizácii a vysokej špecificite predstavuje latexová aglutinácia cenný nástroj urgentnej diagnostiky, najmä pri život ohrozujúcich infekciách, kde je nevyhnutné rýchle terapeutické rozhodnutie.

5.2. Imunofluorescencia

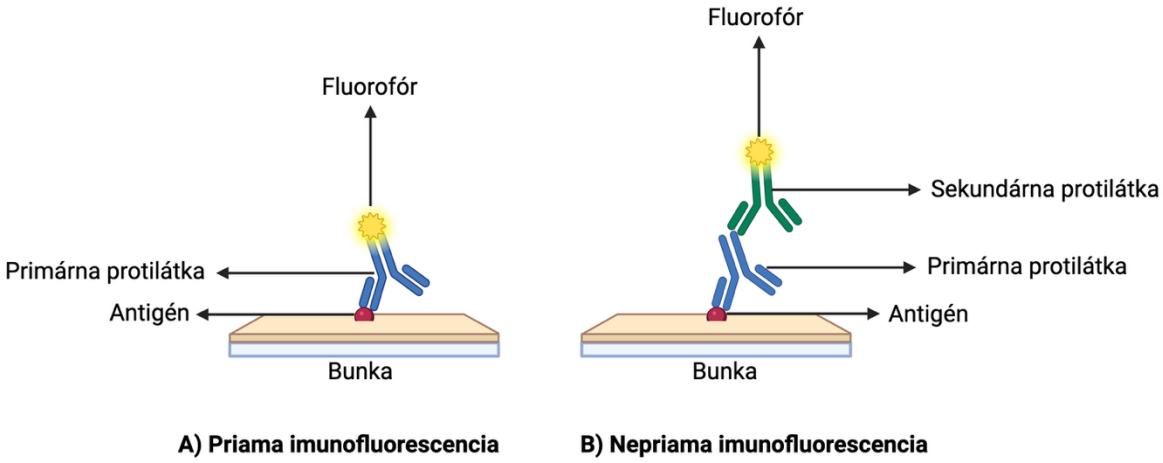
Imunofluorescenčné metódy patria medzi dôležité nástroje laboratórnej diagnostiky infekčných ochorení, pričom ich využitie presahuje rámec mikroskopie aj sérológie. V rámci týchto učebných textov boli už stručne spomenuté v podkapitole 3.1 medzi mikroskopickými metódami.

V praxi rozlišujeme dva základné typy imunofluorescenčných metód:

A) **Priama imunofluorescencia** - fluorescenčne značená primárna protilátka sa viaže priamo na antigén mikroorganizmu prítomný v klinickej vzorke (obr. 10A). Tento formát sa vyznačuje jednoduchosťou a rýchlosťou, pretože vyžaduje len jeden väzbový krok. Vzorka sa následne pozoruje pomocou fluorescenčného mikroskopu.

B) **Nepriama imunofluorescencia** - v prvom kroku sa neznačená primárna protilátka naviaže na cieľový antigén. Následne sa aplikuje fluorescenčne značená sekundárna protilátka, ktorá sa špecificky viaže na konštantnú časť primárnej protilátky (obr. 10B).

Tento prístup zvyšuje citlivosť testu, pretože na jednu primárnu protilátku sa môže naviazať viacero sekundárnych protilátok, čím dochádza k zosilneniu signálu.



Obr. 10: *Priama versus nepriama imunofluorescencia*

Priama imunofluorescencia sa v mikrobiologickej diagnostike využíva najmä na priamu detekciu mikrobiálnych antigénov v klinických vzorkách, ako sú stery z hrdla, nazofaryngeálne výtery, moč alebo tkanivové rezy, a to predovšetkým pri diagnostike vírusových infekcií a infekcií spôsobených intracelulárnymi baktériami. Nepriama imunofluorescencia sa používa najmä na dôkaz špecifických protilátok v sére pacienta, napríklad pri diagnostike syfilisu, leptospirózy alebo toxoplazmózy (tab. 11).

Tab. 11 *Porovnanie imunofluorescenčných metód*

Parameter	Priama imunofluorescencia	Nepriama imunofluorescencia
Citlivosť	Nižšia	Vyššia
Riziko skríženej reaktivity	Nižšie	Vyššie – môže nastať nešpecifická väzba sekundárnej protilátky
Časová náročnosť	Rýchlejšia	Pomalšia
Finančné nároky	Vyššie	Nižšie
Použitie v mikrobiológii	Detekcia antigénu priamo vo vzorke (napr. vírusy, baktérie)	Sérologická diagnostika – detekcia protilátok v sére
Technická náročnosť	Nižšia	Vyššia

5.3. Enzyme-linked immuno sorbent assay

Metóda *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) patrí medzi najrozšírenejšie imunologické techniky využívané v klinickej mikrobiológii. Používa sa na dôkaz špecifických protilátok (sérologická diagnostika) alebo antigénov (napr. vírusových proteínov) v rôznych typoch klinických vzoriek, ako sú sérum, plazma, likvor, stolica alebo moč. ELISA je založená na vysokej špecificite väzby medzi antigénom a protilátkou a jej následnej detekcii pomocou enzýmu naviazaného na jednu zo zložiek reakcie.

Základný princíp metódy ELISA spočíva v imobilizácii jednej zo zložiek imunitnej reakcie (najčastejšie antigénu alebo protilátky) na pevný povrch, spravidla na dno jamiek mikrotitračnej platničky. Po inkubácii s vyšetrovanou vzorkou, ktorá môže obsahovať komplementárnu molekulu (antigén alebo protilátku), sa pridáva detekčná protilátka konjugovaná s enzýmom. Po pridaní substrátu dochádza k enzymatickej premene substrátu na farebný reakčný produkt, prípadne k vzniku chemiluminiscenčného alebo fluorescenčného signálu, ktorého intenzita je priamo úmerná množstvu viazaného antigénu alebo protilátky. Výsledok sa vyhodnocuje spektrofotometricky, prípadne na základe fluorescencie alebo luminiscencie.

Typy ELISA metód:

A) **Priama ELISA** - značená primárna protilátka priamo rozpoznáva a špecificky sa viaže na cieľový antigén imobilizovaný na pevnom povrchu mikrotitračnej platničky. Po inkubácii sa neviazané protilátky odstránia premytím. Do jamky sa následne pridá substrát, ktorý reaguje s enzýmom naviazaným na protilátku. Najčastejšie ide o alkalickú fosfatázu (*alkalic phosphatase*, AP) alebo chrenovú peroxidázu (*horseradish peroxidase*, HRP). Pri AP dochádza k hydrolýze fosfátových skupín substrátu, zatiaľ čo pri HRP k jeho oxidácii, čo vedie k vzniku farebného reakčného produktu, ktorého intenzita je úmerná množstvu prítomného antigénu (obr. 11).

Medzi hlavné výhody priamej ELISA patrí jednoduchosť protokolu, nižšie riziko nešpecifickej väzby v dôsledku absencie sekundárnej protilátky, ako aj časová nenáročnosť. Nevýhodou je nižšia citlivosť v porovnaní s inými typmi ELISA (napr. nepriamou alebo sendvičovou), pretože každá primárna protilátka je konjugovaná len s jednou molekulou enzýmu, čo vedie k obmedzenej detekčnej amplifikácii signálu. V rutinnej klinickej mikrobiológii sa tento typ ELISA používa zriedkavo, napríklad v diagnostike *Mycoplasma bovis*.

B) **Nepriama ELISA** - metóda určená na dôkaz špecifických protilátok v biologickej vzorke, najčastejšie v sére pacienta. Základom metódy je imobilizácia známeho antigénu, charakteristického pre konkrétny patogén (napr. vírus, baktériu alebo

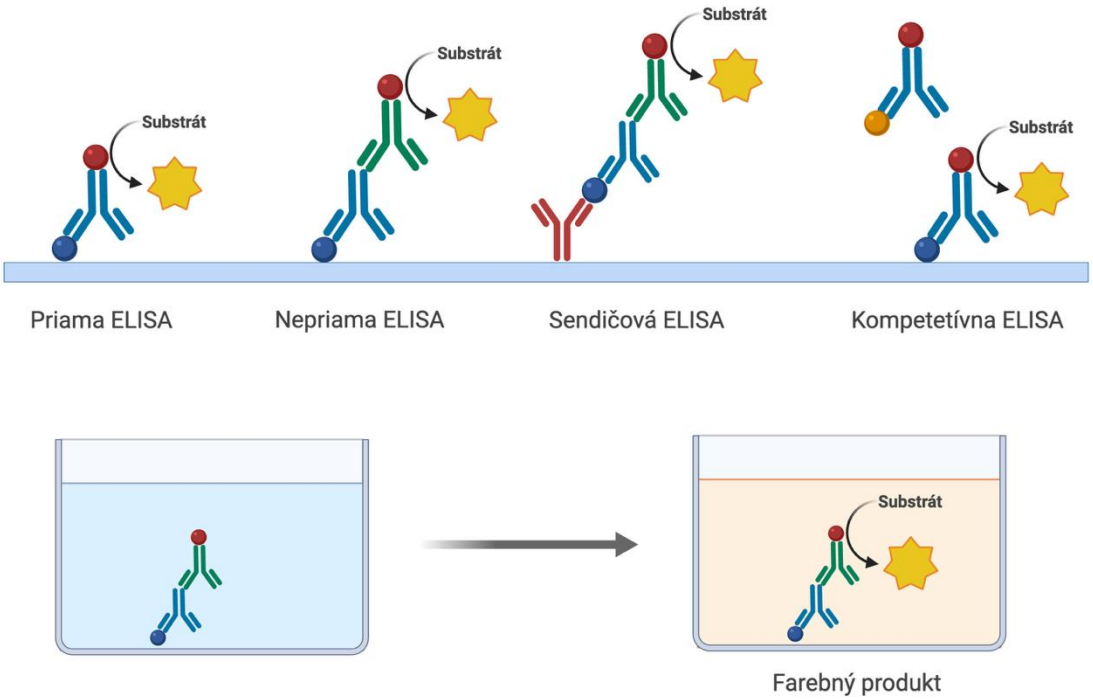
parazita), na pevný povrch mikrotitračnej platničky. Takto naviazaný antigén následne slúži ako väzbové miesto pre protilátky prítomné v testovanej vzorke. Ak sa v sére pacienta nachádzajú špecifické protilátky (napr. triedy IgM alebo IgG), dochádza k ich naviazaniu na antigén. V ďalšom kroku sa pridáva sekundárna protilátka konjugovaná s enzýmom, ktorá sa špecificky viaže na primárne protilátky naviazané na antigén (obr. 11). Po pridaní vhodného substrátu vzniká farebná reakcia, ktorej intenzita je úmerná množstvu prítomných špecifických protilátok v pôvodnej vzorke. Táto metóda je široko využívaná pri sérologickej diagnostike infekčných ochorení (napr. HIV alebo hepatitídy), a to najmä v prípade, že priamy dôkaz patogénu nie je možný alebo je menej spoľahlivý. Nepriama ELISA je vhodná aj na stanovenie dynamiky protilátkovej odpovede, napríklad pri rozlíšení akútnej a prekonanej infekcie.

C) **Sendvičová ELISA** - od priamej a nepriamej ELISA sa líši tým, že na pevný povrch mikrotitračnej platničky sa ako prvá viaže tzv. zachytávajúca protilátka špecifická voči cieľovému antigénu. Následne sa do jamky pridá testovaná vzorka (napr. sérum, plazma alebo iný biologický materiál), ktorá môže obsahovať cieľový antigén. Ak je antigén v testovanej vzorke prítomný, naviaže sa na zachytávajúcu protilátku. Po tomto kroku sa pridáva detekčná protilátka, ktorá sa viaže na iný epitop toho istého antigénu, čím vzniká „sendvičová“ štruktúra – protilátka–antigén–protilátka (obr. 11).

Sendvičová ELISA patrí medzi najcitlivejšie formáty tejto metódy. Využíva sa predovšetkým na kvantitatívnu detekciu antigénov, napríklad pri dôkaze bakteriálnych toxínov, vírusových proteínov alebo antigénov parazitov. Medzi typické klinické aplikácie patrí detekcia rotavírusového antigénu, toxínov A a B produkovaných *Clostridioides difficile* v stolici alebo enterotoxínov produkovaných *Escherichia coli*.

D) **Kompetitívna ELISA** - pri tomto type testu sa v jamkách mikrotitračnej platničky nachádza imobilizovaný antigén. Do každej jamky sa následne pridáva testované sérum, ktoré môže obsahovať špecifické protilátky, a zároveň enzýmom konjugované protilátky so známou afinitou k tomuto antigénu. Obe frakcie protilátok navzájom súťažia o väzbu na antigén. Ak testované sérum obsahuje špecifické protilátky, tieto sa viažu na antigén a inhibujú väzbu enzýmom značených protilátok (obr. 11). Po premytí sa do jamky pridá substrát a intenzita vzniknutého farebného reakčného produktu je nepriamo úmerná koncentrácii protilátok (alebo antigénu) v testovanej vzorke. To znamená, že čím vyššia je koncentrácia špecifických protilátok v sére, tým menšie množstvo enzýmom

značených protilátok sa naviaže a tým slabší je výsledný farebný signál. Kompetitívna ELISA sa využíva najmä pri diagnostike HIV.



Obr. 11: *Schematické znázornenie princípov jednotlivých typov ELISA metód*

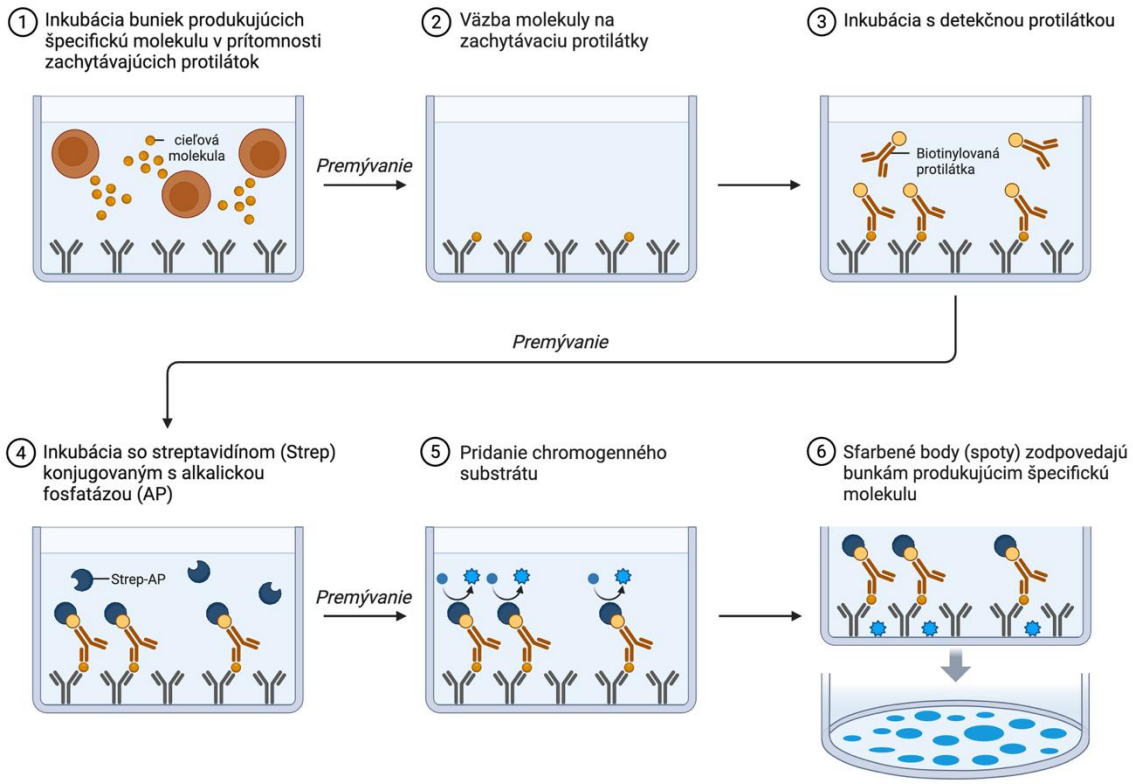
5.4. Enzyme-linked immunosorbent spot

Metóda *enzyme-linked immunosorbent spot* (ELISPOT) je vysoko citlivá imunologická metóda určená na detekciu a kvantifikáciu jednotlivých buniek produkujúcich cytokíny, chemokíny alebo protilátky na základe ich sekrečnej aktivity.

Bunky sa aplikujú na dno mikrotitračných jamiek, ktorých povrch je vopred pokrytý zachytávajúcimi protilátkami namierenými proti analyzovanej molekule. Ak bunky túto molekulu počas inkubácie vylúčia, zachytí sa priamo na imobilizované protilátky na dne jamky. Následne sú bunky odstránené a do jamiek sa pridáva detekčná protilátka, ktorá sa naviaže na zachytenú cieľovú molekulu. Táto protilátka je konjugovaná s enzýmom, ktorý po pridaní substrátu katalyzuje tvorbu farebného produktu vo forme viditeľného bodu (spotu) zodpovedajúcemu jednej aktívnej bunke, čo následne umožňuje kvantitatívne hodnotenie bunkovej imunitnej odpovede (obr. 12).

Metóda ELISPOT sa uplatňuje predovšetkým pri analýze špecifickej bunkovej imunitnej odpovede, napríklad po expozícii infekčnému agens, po očkovaní alebo počas imunoterapie. V klinickej mikrobiológii má osobitný význam najmä v diagnostike latentnej tuberkulózy, kde sa využíva napríklad vo forme testu T-SPOT.TB, ktorý je založený na

detekcii interferónu gama produkovaného T-lymfocytmi po expozícii antigénom *Mycobacterium tuberculosis*.



Obr. 12: *Princíp ELISPOT*

5.5. Multiplexové metódy

Multiplexové imunologické metódy umožňujú simultánnu detekciu viacerých cieľových molekúl (napr. antigénov, protilátok alebo cytokínov) v jednej biologickej vzorke, čím sa výrazne šetrí objem biologického materiálu, čas aj celkové náklady na vyšetrenie. Z tohto dôvodu sú mimoriadne vhodné najmä v situáciách, keď je dostupné len obmedzené množstvo vzorky, napríklad u pediatrických pacientov alebo pri vyšetreniach mozgovomiechového moku. Ich princíp je založený na použití mikročastíc, ktoré sú rozlíšiteľné na základe unikátneho fluorescenčného signálu. Každá skupina mikročastíc je pokrytá špecifickými zachytávajúcimi protilátkami, ktoré viažu konkrétnu molekulu z testovanej vzorky. Po naviazaní analytu sa do reakčnej zmesi pridáva detekčná protilátka konjugovaná s fluorescenčným farbivom, ktorá sa viaže na iné väzbové miesto cieľovej molekuly, čím vzniká tzv. sendvičový komplex (princíp rovnaký ako pri sendičovej ELISA, kap. 5.3). Každý vytvorený komplex je následne identifikovaný podľa špecifického fluorescenčného kódu mikročastice a kvantifikovaný na základe intenzity fluorescencie detekčnej protilátky. Meranie prebieha najčastejšie na prístrojoch fungujúcich na princípe prietokovej cytometrie.

Zvyčajne sa využívajú syndrómovo-orientované panely, napríklad na diferenciálnu diagnostiku respiračných infekcií, kde možno v jednej reakcii detegovať antigény alebo protilátky proti vírusom ako sú vírus chrípky A/B, RSV, adenovírus, vírus parachrípky či koronavírusy. Ďalšou oblasťou využitia je sérologický skríning infekcií prenášaných krvou. Multiplexové testy sa tiež využívajú pri sledovaní hladín viacerých cytokínov v krvi pacientov, čo môže pomôcť v hodnotení imunitnej odpovede pri ťažkých infekciách. Z výskumného hľadiska umožňujú tieto metódy aj sledovanie dynamiky protilátkovej odpovede počas infekcie alebo po očkovaní.

5.6. Imunochromatografické testy

Imunochromatografické testy predstavujú rýchlu a jednoduchú metódu založenú na princípe antigén–protilátkovej reakcie kombinovanej s chromatografickou separáciou na kapilárnom princípe. V klinickej praxi sa využívajú predovšetkým v rámci POCT, pretože umožňujú rýchlu detekciu infekčných agensov alebo špecifických protilátok bez potreby laboratórneho vybavenia. Typickým príkladom sú antigénové testy na SARS-CoV-2.

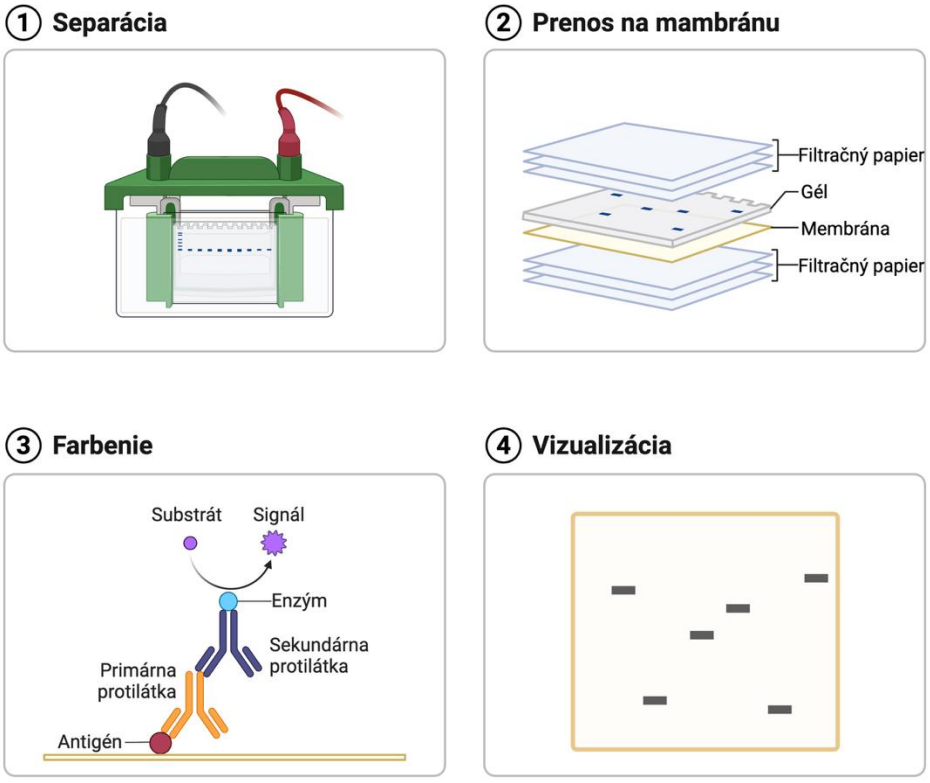
Testovacia kazeta obsahuje prúžok z kapilárneho materiálu (napr. celulózový alebo polymérny nosič), cez ktorý sa tekutá vzorka pohybuje kapilárnym ťahom. V úvodnej časti testovacieho prúžku sa nachádza konjugátová zóna, obsahujúca protilátky značené detekčným markerom, ako je koloidné zlato, latexové častice alebo fluorescenčné farbivo. Po kontakte so vzorkou sa značené protilátky rozpustia a viažu sa na prítomný cieľový antigén, čím vzniká stabilný imunokomplex. Tento komplex následne migruje do testovacej zóny, kde sú imobilizované špecifické zachytávajúce protilátky. Tie zachytia prechádzajúci komplex a vytvoria viditeľný farebný prúžok, ktorý signalizuje pozitívny výsledok vyšetrenia.

Okrem detekcie SARS-CoV-2 sa imunochromatografické testy v klinickej praxi bežne využívajú aj pri diagnostike ďalších vírusových ochorení, napríklad chrípky typu A a B, respiračného syncyciálneho vírusu, ako aj rotavírusovej a adenovírusovej gastroenteritídy. Uplatnenie nachádzajú aj pri bakteriálnych infekciách, napríklad pri dôkaze *Streptococcus pyogenes*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pneumoniae* alebo *Clostridioides difficile*, kde sa používajú kombinované testy na detekciu toxínov A a B v stolici. V diagnostike meningitíd sa tieto testy využívajú priamo z mozgovomiechového moku, pričom najčastejšie detegovanými patogénmi sú *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* a *Cryptococcus neoformans*. V oblasti sexuálne prenosných infekcií sú dostupné rýchle testy na syfilis (*Treponema pallidum*) a HIV, ktoré je možné vykonať aj z kvapky krvi alebo zo slín, čo ich predurčuje na využitie v komunitnom a terénnom prostredí. Na druhej strane, nižšia citlivosť a špecificita oproti iným laboratórnym metódam (ako je PCR alebo ELISA) limitujú ich spoľahlivosť, najmä pri nízkej koncentrácii patogéna.

5.7. Western blot

Western blot je imunoanalytická metóda, ktorá umožňuje nielen detekciu špecifických protilátok, ale aj identifikáciu konkrétnych antigénov na základe ich molekulovej hmotnosti. Na rozdiel od ELISA, ktorá poskytuje informáciu najmä o prítomnosti a koncentrácii protilátok alebo antigénov, *Western blot* umožňuje posúdiť špecificitu imunitnej reakcie voči jednotlivým antigénom patogénu.

Postup *Western blot* analýzy sa začína separáciou zmesi antigénov pomocou elektroforézy v polyakrylamidovom géle (SDS-PAGE), ktorá umožňuje ich rozdelenie podľa molekulovej hmotnosti. Následne sa separované antigény prenášajú („blotujú“) na pevnú membránu, najčastejšie nitrocelulózovú alebo PVDF. Takto pripravená membrána sa inkubuje so sérom pacienta. Ak sú v sére prítomné špecifické protilátky, viažu sa na príslušné antigény imobilizované na membráne. Neviazané protilátky sa po inkubácii odstránia premývaním a naviazané primárne protilátky sa následne detegujú pomocou enzýmovo konjugovaných sekundárnych protilátok, analogicky ako pri metóde ELISA. Po pridaní substrátu dochádza k vzniku detegovateľného signálu a k zviditeľneniu pásov v miestach špecifickej väzby antigén–protilátka (obr. 13).



Obr. 13: *Princíp Western blot metódy*

Výhodou *Western blotu* je, že umožňuje presnú identifikáciu konkrétnych antigénov, ktoré sú rozpoznávané protilátkami v sére pacienta, a tým dokáže rozlíšiť špecifickú imunitnú odpoveď od možnej krížovej reaktivity. Reaktivita iba s jedným antigénom môže predstavovať nešpecifickú alebo krížovú reakciu, prípadne veľmi skorú fázu infekcie, zatiaľ čo reaktivita s viacerými diagnosticky významnými antigénmi svedčí pre špecifickú polyklonálnu imunitnú odpoveď. Táto vlastnosť je kľúčová najmä v diagnostike infekcie vírusom HIV, kde sa za pozitívny nález považuje prítomnosť protilátok proti viacerým definovaným antigénnym proteínom vírusu podľa platných interpretačných kritérií.

Western blot sa ako konfirmačná metóda využíval aj v diagnostike lymskej boreliózy a hepatitídy typu C, kde umožňoval posúdiť špecificitu protilátkovej odpovede voči jednotlivým antigénom patogénu.

5.8. Perspektívne imunologické metódy

Neustály pokrok v imunológii a nanotechnológiách vedie k vývoju nových imunodiagnostických prístupov, ktoré svojimi vlastnosťami vykazujú potenciál doplniť alebo v budúcnosti čiastočne nahradiť konvenčne využívané metódy. Tieto technológie sa v súčasnosti uplatňujú predovšetkým vo výskume, avšak viaceré z nich majú perspektívu širšieho zavedenia do rutinnej klinickej diagnostiky infekčných ochorení.

5.8.1. Digitálna ELISA

Digitálna ELISA predstavuje technologicky pokročilú modifikáciu klasickej metódy ELISA, ktorá umožňuje kvantifikáciu analytov na úrovni jednotlivých molekúl. Najznámejším predstaviteľom tejto technológie je platforma SiMoA (*Single Molecule Array*), ktorá využíva mikroskopické magnetické častice s naviazanými zachytávajúcimi protilátkami. Po naviazaní cieľovej molekuly a značení detekčnou protilátkou sa častice distribuujú do tisícov mikrojamiek s femtolitrovým objemom, pričom každá obsahuje buď žiadnu, alebo jednu časticu. Reakcia prebieha izolovane v jednotlivých mikrojamkách a výsledný fluorescenčný signál je detegovaný ako pozitívna alebo negatívna reakcia. Vďaka tomuto prístupu je možné detegovať ultranízke koncentrácie cieľových molekúl. Preto je táto metóda 100- až 1000-násobne citlivejšie než tradičná ELISA.

V oblasti diagnostiky infekčných ochorení nachádza digitálna ELISA uplatnenie napríklad pri ultrasenzitívnej detekcii antigénu p24 vírusu HIV-1, čo umožňuje zachytiť infekciu ešte pred sérokonverziou. Rovnako bola využitá pri detekcii špecifických proteínov vírusu SARS-CoV-2 s dosiahnutým limitom detekcie v rozsahu desiatok femtogramov na mililiter. Medzi hlavné nevýhody digitálnej ELISA v súčasnosti patrí najmä jej vyššia technologická a finančná náročnosť.

5.8.2. Imunosenzory

Imunosenzory predstavujú modernú kategóriu analytických nástrojov, ktoré spájajú špecificitu imunologických interakcií (napríklad väzba antigénu a protilátky) s citlivými fyzikálnymi detekčnými technológiami. Základom týchto zariadení je biologická rozpoznávacia zložka (najčastejšie protilátka) naviazaná na povrch senzora, ktorá po zachytení cieľovej molekuly (napr. antigénu mikroorganizmu) vyvolá fyzikálnu zmenu. Táto zmena je následne prevedená na kvantifikovateľný signál (napríklad optický, elektrochemický alebo termálny). V oblasti klinickej mikrobiológie sa tieto zariadenia uplatňujú najmä pri rýchlej identifikácii patogénov ako *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, ako aj pri detekcii bakteriálnych alebo vírusových toxínov, či špecifických protilátok.

Významnou výhodou biosenzorov oproti klasickým metódam je ich časová nenáročnosť (často nevyžadujú zložité preplachovacie kroky, čím sa čas do získania výsledkov skracuje na desiatky minút) a potenciálna možnosť miniaturizácie, čo ich predurčuje na využitie v rámci POCT. Nevýhodou je však obmedzená stabilita niektorých biosenzorov, potreba optimalizácie pre konkrétny cieľ a vyššie náklady spojené s vývojom, validáciou a zavedením do klinickej praxe. Napriek týmto limitáciám majú imunodiagnostické biosenzory značný potenciál ako nástroje budúcnosti v oblasti presnej a rýchlej diagnostiky infekčných ochorení.

5.8.3. Lab-on-a-Chip

Mikrofluidické technológie, známe aj ako *lab-on-a-chip* (LoC), predstavujú pokročilé diagnostické platformy, ktoré integrujú viacero laboratórnych krokov (napr. prípravu vzorky, miešanie, inkubáciu, detekciu a analýzu výsledkov) do jedného miniatúrneho zariadenia, často veľkosti mikroskopického sklíčka. Využívajú systém mikrokanálikov, mikroventilov a mikropúmp na manipuláciu s veľmi malými objemami kvapalín (v rozsahu nano- až mikrolitrov), čím umožňujú rýchle, automatizované a vysoko efektívne vykonanie komplexných diagnostických reakcií, vrátane imunochemických analýz.

Zatiaľ čo biosenzory predstavujú technológie primárne zamerané na samotnú detekciu biologickej interakcie (napr. väzby antigén–protilátka) a jej konverziu na merateľný signál (optický, elektrochemický, piezoelektrický a pod.), mikrofluidické systémy predstavujú komplexné diagnostické platformy, ktoré zahŕňajú celý analytický proces od spracovania vzorky až po vyhodnotenie výsledku.

Hlavnými výhodami LoC technológií sú vysoká rýchlosť analýzy, automatizácia, nízka spotreba vzorky a reagencií, ako aj možnosť integrácie do prenosných diagnostických zariadení, čo ich predurčuje na využitie v POCT diagnostike. Príkladom je

ich využitie v rýchlej diagnostike infekčných ochorení, napríklad meningitíd, respiračných vírusov alebo sexuálne prenosných infekcií.

Zhrnutie kapitoly

Imunologické metódy tvoria neoddeliteľnú súčasť diagnostiky infekčných ochorení, pretože umožňujú rýchlu a špecifickú detekciu antigénov patogénov alebo protilátkovej odpovede hostiteľa. Ich hlavnou prednosťou je vysoká špecificita väzby antigén–protilátka, ktorá umožňuje spoľahlivú identifikáciu patogénov. Významnou výhodou je tiež časová nenáročnosť, keďže mnohé z týchto metód poskytujú výsledok v priebehu niekoľkých minút až hodín a sú vhodné pre urgentné klinické situácie či POCT.

Limitujúcim faktorom imunologických metód je ich čiastočná závislosť od dynamiky imunitnej odpovede, čo môže viesť k falošne negatívnym výsledkom pri skorých štádiách infekcie alebo u imunokompromitovaných pacientov. Pri testoch zameraných na detekciu protilátok je potrebné počítať s časovým oneskorením sérokonverzie, zatiaľ čo pri detekcii antigénov môže citlivosť klesať pri nízkej koncentrácii patogéna. Niektoré metódy sú náchylné na skríženú reaktivitu, najmä pri použití sekundárnych protilátok, a vyžadujú preto opatrnú interpretáciu výsledkov.

Celkovo imunologické metódy predstavujú flexibilnú skupinu diagnostických nástrojov s mimoriadnym významom v situáciách, kde je potrebná rýchlosť, vysoká špecificita a schopnosť detegovať patogény nezávisle od kultivácie. Ich správne využitie však vyžaduje znalosť ich limitácií, pochopenie imunologickej kinetiky a vhodné kombinovanie s molekulárnymi či spomínanými kultivačnými metódami.

Kontrolné otázky (iba jedna správna odpoveď)

1. Prečo sú IgM protilátky obzvlášť vhodné na aglutinačné reakcie?
A. majú najmenšiu molekulovú hmotnosť
B. sú monomérne
C. sú pentamérne a viažu viac antigénov naraz
D. neaktivujú komplement

2. Prečo je latexová aglutinácia vhodná najmä pre urgentnú diagnostiku meningitíd?
A. Umožňuje stanoviť antibiotickú citlivosť.
B. Je citlivejšia než PCR.
C. Umožňuje stanoviť titre protilátok.
D. Je rýchla, jednoduchá a vysoko špecifická.

3. Aké je hlavné využitie nepriamej imunofluorescencie v klinickej mikrobiologickej diagnostike?

A. sérologický dôkaz špecifických protilátok proti vybraným patogénom
B. priama identifikácia bakteriálnych exotoxínov v klinickom materiáli
C. stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie antimikrobiálnych látok
D. molekulárna genotypizácia vírusových kmeňov

4. Pacient prichádza so suspektnou, ale nejasnou prekonanou infekciou. Lekár požaduje metódu, ktorá by pomohla stanoviť dynamiku protilátkovej odpovede a rozlíšiť medzi akútnou a prekonanou fázou. Ktorá z uvedených ELISA metód je na tento účel primárne určená?

A. priama ELISA
B. nepriama ELISA
C. sendvičová ELISA
D. kompetitívna ELISA

5. Pacient má pozitívny výsledok skríningového ELISA testu na HIV. Lekár potrebuje vykonať potvrdzujúci test, ktorý dokáže s vysokou špecifitou určiť, či ide skutočne o infekciu HIV s polyklonálnou imunitnou odpoveďou, alebo či ide len o náhodnú skríženú reaktivitu s inými antigénmi.
Ktorú z nasledujúcich metód by ste použili?

A. Western blot
B. priama imunofluorescencia
C. nepriama ELISA
D. latexová aglutinácia

6. U 55-ročného pacienta, ktorý nedávno emigroval z oblasti s vysokou prevalenciou, je podozrenie na latentnú tuberkulózu. Pre potvrdenie diagnózy je potrebné analyzovať bunkovú imunitnú odpoveď, konkrétne kvantifikovať aktivitu T-lymfocytov (prostredníctvom produkcie interferónu gama) po expozícii antigénom *Mycobacterium tuberculosis*. Ktorá metóda by bola najvhodnejšia?

A. sendvičová ELISA
B. ELISPOT
C. imunochromatografický test
D. kompetitívna ELISA

7. Imunochromatografické testy (napr. rýchlotesty na SARS-CoV-2) sú často využívané v POCT (*Point-of-Care Testing*). Ktoré z nasledujúcich obmedzení týchto testov by mal lekár zohľadniť pri interpretácii negatívneho výsledku?

A. Vyžadujú dlhú inkubačnú dobu a zložité laboratórne vybavenie.
B. Poskytujú presnú kvantifikáciu koncentrácie antigénu.
C. Majú nižšiu citlivosť a špecificitu oproti iným laboratórnym metódam.
D. Slúžia výhradne na detekciu protilátok IgG, nie antigénov.

8. Pacient prichádza s typickým klinickým obrazom chrípky 24 hodín od začiatku príznakov. Sérologické vyšetrenie protilátok je negatívne. Ktoré tvrdenie najlepšie vystihuje negatívny sérologický nález?

A. Protilátky triedy IgG sa ešte nestihli vytvoriť.
B. Protilátky triedy IgM sa tvoria až po 2–3 mesiacoch.
C. Imunologické metódy nie sú použiteľné pri vírusoch.
D. Protilátky sa nikdy netvoria pri akútnych infekciách.

9. Ktorá z uvedených metód, aj napriek svojej vysokej technologickej a finančnej náročnosti, poskytuje najvyššiu citlivosť (kvantifikáciu na úrovni jednotlivých molekúl)?

A. nepriama imunofluorescencia
B. sendvičová ELISA
C. digitálna ELISA
D. imunochromatografický test

10. Ktorý faktor najviac ovplyvňuje špecificitu imunologických testov?

A. koncentrácia elektrolytov vo vzorke
B. typ použitého detekčného substrátu
C. rýchlosť enzymatickej reakcie
D. afinitná väzba medzi antigénom a protilátkou

Správne odpovede na strane 84.

6. ANALYTICKÉ METÓDY

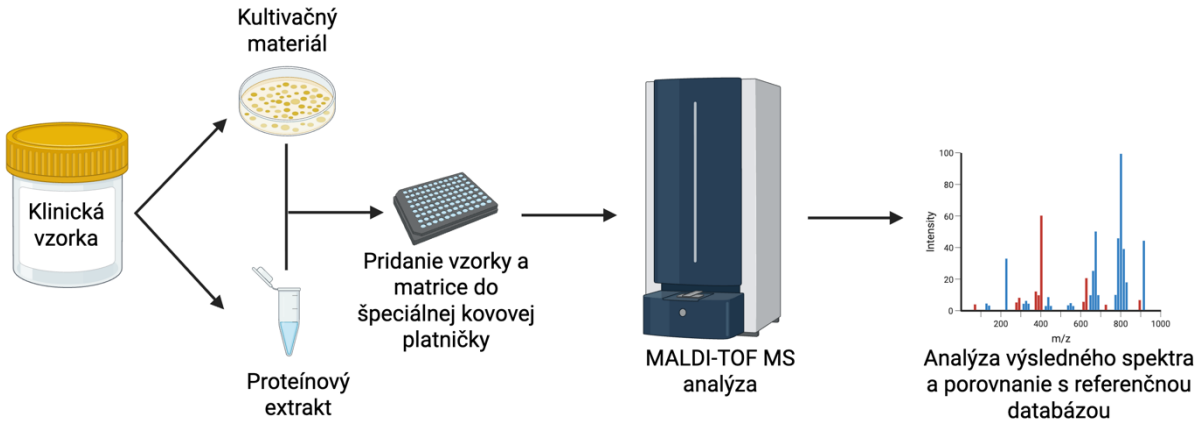
Diagnostika infekčných ochorení sa v posledných desaťročiach výrazne rozšírila o nové technologické prístupy, ktoré dopĺňajú klasické mikrobiologické, molekulárno-biologické a imunologické metódy. Významný pokrok zaznamenali najmä analytické metódy založené na princípoch hmotnostnej spektrometrie (*mass spectrometry*, MS), chromatografie, spektroskopie a chemometrie. Tieto analytické prístupy umožňujú rýchlu, vysoko citlivú a presnú identifikáciu mikroorganizmov, často v krátkom čase a s minimálnou alebo žiadnou potrebou predchádzajúcej kultivácie. V niektorých prípadoch je výsledok dostupný takmer v reálnom čase, čo významne urýchľuje rozhodovanie o optimálnom terapeutickom postupe. V klinickej mikrobiológii sa tieto metódy využívajú najmä na identifikáciu mikroorganizmov na základe ich hmotnostných profilov, ako aj na detekciu metabolitov mikrobiálneho pôvodu.

6.1. MALDI-TOF MS

MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight*) MS predstavuje analytickú technológiu, ktorá umožňuje rýchlu a presnú identifikáciu mikroorganizmov na základe ich proteínového profilu. Metóda využíva princíp ionizácie chemických funkčných skupín proteínov pomocou laserového lúča, pričom sa následne analyzuje ich hmotnostné spektrum. Vyšetrovaná vzorka, zvyčajne vo forme čistej bakteriálnej kolónie alebo predpripraveného proteínového extraktu, sa zmieša so špeciálnou chemickou matricou, ktorej úlohou je absorbovať energiu z laserového lúča. Vytvorené nabité molekuly (ióny) sa následne urýchľujú v elektrickom poli do tzv. letovej trubice. V nej sa pohybujú rôznou rýchlosťou v závislosti od svojej hmotnosti a náboja, čo znamená, že čím je ión ľahší, tým skôr dorazí k detektoru. Takýmto spôsobom sa vytvorí charakteristický hmotnostný profil (spektrogram), ktorý predstavuje „odtlačok prsta“ daného mikroorganizmu. Tento profil sa potom porovnáva s referenčnými údajmi v databázach, čo umožní identifikovať konkrétny druh mikroorganizmu (obr. 14).

Metóda MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie sa v klinickej praxi využíva predovšetkým na rýchlu a presnú identifikáciu baktérií a kvasiniek na úrovni rodu a druhu, pričom jej využitie sa v posledných rokoch rozšírilo aj na identifikáciu vláknitých húb. V experimentálnych a výskumných podmienkach sa skúma aj jej potenciálne využitie pri identifikácii vírusov, ktoré však zatiaľ nepredstavuje rutinnú súčasť klinickej diagnostiky.

Medzi hlavné výhody tejto technológie patrí veľmi krátky čas spracovania vzorky, keďže výsledok je často dostupný už do 30 minút. Po počiatočnej investícii do prístroja sú prevádzkové náklady nízke, najmä vďaka minimálnej spotrebe reagencií.



Obr. 14: *Princíp MALDI-TOF MS*

Nevýhodou zostáva nevyhnutnosť predchádzajúcej kultivácie, preto nie je vhodná na priamu diagnostiku z klinickej vzorky pacienta. Okrem toho je úspešnosť identifikácie limitovaná kvalitou a rozsahom referenčnej databázy, preto zriedkavé alebo menej študované patogény nemusia byť správne identifikované. Napriek týmto obmedzeniam je MALDI-TOF MS dnes považovaná za jeden z najefektívnejších nástrojov rutinnej mikrobiálnej identifikácie.

Technológia MALDI-TOF MS sa v posledných rokoch ukazuje aj ako nádejný nástroj na rýchlu detekciu niektorých mechanizmov rezistencie priamo z izolovaných kultúr mikroorganizmov.

Spôsoby využitia v stanovení rezistencie:

- **Detekcia enzýmovej aktivity** - pri tomto prístupe sa testovaný kmeň inkubuje s konkrétnym antibiotikom (napr. zo skupiny karbapenémov). Po inkubácii sa pomocou MALDI-TOF MS analyzuje prítomnosť produktov hydrolýzy, ktoré vznikli rozkladom antibiotika prostredníctvom špecifických enzýmov (napr. β-laktamáz). Zmeny v hmotnostnom spektre (vymiznutie signálu pre antibiotikum a vznik nových píkov), umožňujú potvrdiť enzymatickú degradáciu liečiva a tým prítomnosť rezistentného kmeňa vybraného mikroorganizmu.
- **Identifikácia biomarkerov asociovaných s rezistenciou** – v súčasnosti sa využitie MALDI-TOF MS zameriava aj na detekciu špecifických proteínových a lipidových biomarkerov, ktoré sú typické pre rezistentné kmene mikroorganizmov. Na rozdiel od priamych funkčných testov ide v tomto prípade o nepriame dôkazy, ktoré využívajú porovnanie hmotnostných spektier medzi citlivými a rezistentnými izolátmi. V súvislosti s proteínovými biomarkermi bol napríklad u *Klebsiella pneumoniae* produkujúcej enzým karbapenemázu (KPC) identifikovaný špecifický pík s hmotnosťou 11 109 Da, ktorý sa vyskytoval vo väčšine KPC-pozitívnych kmeňov a chýbal u negatívnych izolátov. Niektoré mechanizmy rezistencie, ako

napr. expresia génu *mcr-1* (rezistencia na kolistín), vedú k špecifickým modifikáciám lipidu A (časť lipopolysacharidu v membráne gram-negatívnych baktérií). U *Pseudomonas aeruginosa* nesúcej gén *mcr-1* bol detegovaný pík 1 569 Da, ktorý chýbal u citlivých izolátov. Podobné posuny boli popísané aj u *Klebsiella pneumoniae* a *Morganella morganii*.

MALDI-TOF MS sa využíva aj na rozpoznávanie epidemiologicky významných klonov. Príkladom je ST175 klon *Pseudomonas aeruginosa*, ktorý je asociovaný s multirezistenciou a je prevalentný v Európe. Tento klon má stabilne prítomné dva biomarkery s hodnotami 6 911 a 7 359 Da, ktoré ho odlišujú od ostatných klonov.

Výhodou takéhoto prístupu je možnosť integrácie do rutinnej klinickej praxe bez potreby inkubácie s vybraným antibiotikom. Nevýhodou však zostáva, že väčšina biomarkerov je špecifická len pre určité typy rezistencie alebo konkrétne klony, a preto ich neprítomnosť nevylučuje rezistenciu.

- **Hodnotenie rastu mikroorganizmov v prítomnosti antibiotika -** existuje viacero experimentálnych metód založených na analýze rastu baktérií za prítomnosti alebo neprítomnosti antibiotika. Napríklad:

  ***MALDI Biotyper-Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay* (MBT-ASTRA)** - porovnáva zmeny v spektre pred a po inkubácii s antibiotikom. Metóda sa preukázala byť účinná pri stanovení rezistencie *Mycobacterium tuberculosis* na rifampicín, izoniazid, etambutol a linezolid, a taktiež pri stanovení rezistencie netuberkulóznych mykobaktérií na rifabutín a klaritromycín.

  ***Direct-On-Target Microdroplet Growth Assay* (DOT-MGA)** - ide o rýchlu metódu testovania antibiotickej citlivosti, pri ktorej sa mikroskopické kvapky o objeme približne 6 µl, obsahujúce suspenziu testovaného mikroorganizmu, inkubujú priamo na cieľovej platničke prístroja MALDI-TOF MS, a to v prítomnosti vybraného antibiotika a paralelne aj bez jeho prítomnostis (kontrola rastu). Po 4–5 hodinách inkubácie (v závislosti od druhu mikroorganizmu) sa analyzuje prítomnosť alebo neprítomnosť bakteriálneho rastu na základe zmien v proteínovom spektre. Metóda bola úspešne validovaná napríklad pre detekciu rezistencie *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa* na meropeném.

6.2. Kvapalinová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou

Kvapalinová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou (LC-MS) predstavuje analytickú metódu, ktorá umožňuje separáciu a následnú identifikáciu širokého spektra biologicky aktívnych látok vrátane metabolitov, lipidov, proteínov či liečiv. V prvom kroku

sa jednotlivé zložky vzorky separujú na základe ich chemických vlastností (napr. polarita, veľkosť, náboj) pomocou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC). Následne sú jednotlivé zložky ionizované a zavádzané do hmotnostného spektrometra, kde sa analyzujú podľa pomeru hmotnosti k náboju (m/z). Tento prístup umožňuje vysoko selektívnu a mimoriadne citlivú detekciu aj veľmi nízkych koncentrácií cieľových molekúl v komplexných biologických vzorkách.

Jedným z klasických príkladov využitia je identifikácia bakteriálnych druhov rodu *Mycobacterium*, nakoľko umožňuje spoľahlivé rozlíšenie medzi *Mycobacterium tuberculosis* a netuberkulóznymi mykobaktériami. LC-MS sa využíva aj pri analýze metabolitov a lipidov iných klinicky významných baktérií, napríklad na detekciu mastných kyselín a fosfolipidov u *Clostridium difficile*, membránových lipidov *Pseudomonas aeruginosa*, či toxínov produkovaných *Bacillus cereus* a *Staphylococcus aureus*. Tieto molekulárne markery pomáhajú pri identifikácii druhu aj pri hodnotení virulenčného potenciálu vybraného kmeňa. V neposlednom rade má LC-MS význam aj v analýze vírusových a kvasinkových antigénov (napr. v diagnostike SARS-CoV-2 alebo *Candida albicans*).

V rámci personalizovanej medicíny sa LC-MS uplatňuje pri stanovení koncentrácií antimikrobiálnych látok v plazme (napr. vankomycín, linezolid, tigecyklín, antituberkulotiká), čo umožňuje terapeutické monitorovanie liečiv nevyhnutné najmä u kriticky chorých pacientov, u ktorých sú často výrazne ovplyvnené farmakokinetické parametre.

6.3. Plynová chromatografia

Plynová chromatografia (GC) je analytická metóda využívajúca separáciu prchavých látok na základe ich fyzikálno-chemických vlastností, najmä rozdielnej prchavosti a afinity k stacionárnej fáze v chromatografickej kolóne. V mikrobiológii sa GC využíva na detekciu a identifikáciu špecifických metabolických produktov mikroorganizmov, často vo forme prchavých organických látok (VOCs) alebo mastných kyselín, ktoré sú charakteristické pre jednotlivé druhy mikroorganizmov.

Klinické využitie:

- **Identifikácia anaeróbnych baktérií** - často vyžaduje kombináciu viacerých diagnostických prístupov. GC sa v tomto prípade používa na analýzu produktov fermentácie glukózy alebo na detekciu metabolitov mastných kyselín, najmä ich metylesterov, ktoré vznikajú transesterifikáciou bunkových lipidov. Výsledkom je charakteristický profil mastných kyselín, ktorý je druhovo špecifický a môže byť diagnosticky významný pri rozlišovaní jednotlivých druhov anaeróbnych mikroorganizmov.

- **Diagnostika tuberkulóznej meningitídy** - GC alebo GC-MS možno využiť na detekciu tuberkulostearovej kyseliny, ktorá je špecifická pre bunkovú stenu mykobaktérií. Táto zlúčenina sa môže uvoľňovať do likvoru pacientov s tuberkulóznou meningitídou, a keďže *Mycobacterium tuberculosis* je prakticky jediný patogén spôsobujúci meningitídu, ktorý uvoľňuje túto zlúčeninu, jej prítomnosť v likvore má klinický význam pre diagnózu tohoto ochorenia.
- **Diagnostika infekcie priamo z vydychovaného vzduchu (*breathomics*)** – ďalšou výhodou GC-MS je možnosť detekcie VOC vo vydychovanom vzduchu. Tento prístup, tzv. „metabolický odtlačok“ z dychu sa označuje ako *breathomics*.

  Vydychovaný vzduch pacienta sa zachytáva do špeciálnych kontajnerov a následne sa analyzuje pomocou GC-MS, pričom dochádza k separácii jednotlivých zlúčenín podľa ich prchavosti a chemických vlastností. V druhom kroku sú tieto zlúčeniny identifikované a kvantifikované na základe ich hmotnostného spektra.

  V rámci výskumu sa identifikovali VOC profily asociované s respiračnými infekciami, ako sú pneumónie, infekcie dýchacích ciest a tuberkulóza, čím sa vytvára potenciál pre rýchlu diagnostiku bez potreby invazívneho odberu biologického materiálu. S postupnou miniaturizáciou analytických zariadení a rozvojom umelej inteligencie (AI) na spracovanie a interpretáciu komplexných VOC profilov sa predpokladá, že analýza vydychovaného vzduchu sa stane významnou súčasťou personalizovanej diagnostiky infekčných ochorení. Jej najväčší prínos sa očakáva najmä v rámci POCT, vrátane monitorovania odpovede na antibiotickú liečbu.

GC a GC-MS predstavujú vysoko citlivé a špecifické analytické nástroje, ktoré však v klinickej praxi čelia viacerým praktickým obmedzeniam. Jednou z hlavných nevýhod je technická a finančná náročnosť. Príprava biologických vzoriek býva často komplikovaná a časovo náročná, keďže zahŕňa viaceré kroky ako extrakciu alebo chemickú derivatizáciu, čo môže viesť k strate analytu alebo kontaminácii. Navyše, koncentrácie metabolitov vo vydychovanom vzduchu či iných telesných tekutinách môžu byť ovplyvnené diétou, liekmi alebo podmienkami odberu a následným uchovaním klinických vzoriek, čo znižuje spoľahlivosť výsledkov a komplikuje štandardizáciu.

6.4. Vibračná spektroskopia

Vibračná spektroskopia zahŕňa skupinu analytických metód, ktoré analyzujú vibračné módy chemických väzieb v molekulách, a tým umožňujú charakterizáciu chemického zloženia buniek a identifikáciu mikroorganizmov. Medzi najvýznamnejšie techniky patria povrchom zosilnená Ramanova spektroskopia (SERS) a Fourierova

transformovaná infračervená spektroskopia (FT-IR). Obe metódy umožňujú rýchlu a neinvazívnu identifikáciu mikroorganizmov priamo z klinického materiálu, často bez potreby predchádzajúcej kultivácie, značenia alebo amplifikácie nukleových kyselín. Výsledkom analýzy sú charakteristické vibračné spektrá, ktoré odrážajú celkové biochemické zloženie mikrobiálnej bunky a môžu byť vyhodnocované porovnaním s referenčnými spektrálnymi databázami.

Pri FT-IR je vzorka ožiarená infračerveným svetlom a analyzuje sa absorpcia jednotlivých vlnových dĺžok, ktorá zodpovedá vibračným módom väzieb v molekulách (napr. C–H, N–H, C=O).

SERS využíva Ramanov jav, tzv. rozptyl svetla na molekulách, pričom signál je zosilnený vďaka interakcii s kovovým povrchom. Týmto spôsobom možno detegovať aj extrémne nízke koncentrácie analytov, dokonca na úrovni jednej bunky.

Na základe vibračných spektier je v klinickej mikrobiológii možné identifikovať široké spektrum mikroorganizmov, vrátane baktérií (*Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*), vírusov (napr. SARS-CoV-2) a kvasiniek (*Candida* spp.), ako aj vláknitých húb (*Aspergillus* spp.). Okrem druhovej identifikácie umožňujú tieto metódy v niektorých prípadoch rozlíšiť aj jednotlivé kmene v rámci druhu, čo má význam pri epidemiologickom sledovaní prenosu a šírenia infekčných ochorení.

Potenciál vibračnej spektroskopie sa preukázal aj pri detekcii antimikrobiálnej rezistencie, a to prostredníctvom identifikácie charakteristických zmien v lipidovom a proteínovom spektre bunky. Tieto zmeny je možné detegovať už v priebehu približne 2 hodín od expozície antibiotiku, čo môže významne prispieť k rýchlej diferenciácii citlivých a rezistentných kmeňov, napríklad pri rozlíšení meticilín-citlivých a meticilín-rezistentných kmeňov *Staphylococcus aureus*.

Zhrnutie kapitoly

Analytické metódy predstavujú rýchlo sa rozvíjajúcu skupinu technológií, ktoré významne rozširujú diagnostické možnosti klinickej mikrobiológie, aj s ohľadom na detekciu rezistencie na antiinfektíva. Techniky založené na hmotnostnej spektrometrii, chromatografii a vibračnej spektroskopii umožňujú rýchlu, presnú a vysoko reprodukovateľnú identifikáciu mikroorganizmov na základe ich proteínových, lipidových alebo metabolických profilov, často s minimálnou potrebou kultivácie. Ich hlavnými prednosťami sú časová nenáročnosť, vysoká miera automatizácie, relatívne nízke prevádzkové náklady pri rutinnom použití a schopnosť poskytovať komplexné biochemické informácie, ktoré presahujú rámec tradičných fenotypových metód.

Klinický význam analytických metód zdôrazňuje aj možnosť detekcie mechanizmov antimikrobiálnej rezistencie, analýza špecifických biomarkerov slúžiaca na

odlíšenie epidemiologicky významných klonov a monitorovanie antibiotickej terapie. V oblasti rýchlej diagnostiky predstavujú perspektívny smer náhrady alebo doplnenia molekulárnych techník, najmä v situáciách, kde je potrebná expresná identifikácia patogéna a včasné terapeutické rozhodovanie.

Tab. 12 *Porovnanie princípu vybraných analytických metód a ich využitie v klinickej mikrobiológii*

Metóda	Princíp	Výhody a klinické využitie
MALDI-TOF MS	Ionizácia funkčných skupín proteínov laserom a generovanie hmotnostného spektra; vzniknuté spektrum sa porovnáva s databázou referenčných proteínových profilov mikroorganizmov.	Rýchla a presná identifikácia baktérií a húb primárne z kultivačného materiálu (v priebehu minút). Vhodná na rutinnú diagnostiku bežných klinických izolátov.
GC-MS	Separácia a identifikácia prchavých metabolitov a mastných kyselín podľa retenčného času a hmotnostného spektra.	Vhodná pre identifikáciu anaeróbov, lipidových markerov (napr. tuberkulostearová kyselina) a analýzu biomarkerov vo vydychovanom vzduchu.
LC-MS / HPLC-MS	Separácia zložiek v kvapalnej fáze podľa polarity a molekulovej hmotnosti a ich následná detekcia.	Umožňuje presnú analýzu metabolitov a proteínov mikroorganizmov. Vhodná tiež pre farmakokinetické a toxikologické štúdie a detekciu biomarkerov infekcie.
Vibračná spektroskopia	Vyhodnotenie schopnosti molekúl absorbovať alebo rozptyľovať svetlo: FT-IR meria absorpciu infračerveného žiarenia; SERS zosilňuje Ramanov rozptyl interakciou so strieborným alebo zlatým povrchom.	Poskytuje charakteristický „molekulárny odtlačok“ mikroorganizmov. Vhodná pre identifikáciu bakteriálnych druhov a prítomnosti rezistencie.

Kontrolné otázky (iba jedna správna odpoveď)

1. Prečo analytické metódy dokážu zachytiť účinok antibiotika skôr než kultivačné testy citlivosti?

A. Sledujú genetické mutácie baktérií.

B. Sledujú bezprostredné metabolické a proteínové zmeny bunky.

C. Sledujú tvorbu kolónií.

D. Sledujú tvorbu protilátok.

2. Na urgentný príjem je privezený pacient v septickom šoku. Lekár odberie hemokultúru a požaduje čo najrýchlejšiu identifikáciu patogénu, aby mohol nasadiť cielenú antibiotickú liečbu. Laboratórium použije MALDI-TOF MS, ktoré dokáže poskytnúť výsledok do 30 minút. Aká je v tomto prípade hlavná nevýhod tejto metódy?

A. Metóda je primárne zameraná na detekciu mastných kyselín a nie proteínov.

B. Vysoká koncentrácia solí a iných proteínov v krvi ruší signál.
C. Predchádzajúca kultivácia mikroorganizmu.
D. Nevyhnutnosť izolácie nukleovej kyseliny.

3. Čo je základným princípom tzv. „*breathomics*“?
A. analýza protilátok vo vydychovanom vzduchu
B. detekcia aerosólových baktérií mikroskopicky
C. sekvenovanie RNA zo vzduchu
D. detekcia prchavých metabolitov zo vzduchu pomocou GC-MS

4. Aký je hlavný limitujúci faktor správnej identifikácie mikroorganizmu pomocou MALDI-TOF MS?
A. kvalita referenčnej databázy
B. dĺžka laserového lúča
C. teplota inkubácie
D. pH kultivačného média

5. Ktoré tvrdenie o vibračnej spektroskopii je správne?
A. Neumožňuje rozlíšenie kmeňov.
B. Je invazívna a vyžaduje biopsiu.
C. Deteguje zmeny v lipidovom a proteínovom spektre.
D. Slúži len na detekciu vírusov.

6. U pacienta s intraabdominálnym abscesom sa predpokladá infekcia obligátnymi anaeróbnymi baktériami. Identifikácia prebieha na základe detekcie metabolitov mastných kyselín. Ktorá metóda je najvhodnejšia?
A. MALDI-TOF MS
B. LC-MS
C. FT-IR
D. GC-MS

7. Nevýhodou detekcie biomarkerov rezistencie pomocou MALDI-TOF MS je:
A. časová náročnosť
B. biomarkery sú často špecifické len pre konkrétne mechanizmy
C. nevyhnutnosť predchádzajúcej PCR amplifikácie
D. vysoká spotreba reagencií

Správne odpovede na strane 84.

7. VYUŽITIE UMELEJ INTELIGENCIE V DIAGNOSTIKE INFEKČNÝCH OCHORENÍ A PERSONALIZOVANEJ MEDICÍNE

Umelá inteligencia (*artificial intelligence*, AI) sa stala neoddeliteľnou súčasťou modernej diagnostiky infekčných ochorení. V klinickej mikrobiológii predstavuje prelom v tom, ako sa identifikujú mikroorganizmy, analyzujú biologické vzorky a interpretujú komplexné laboratórne a klinické dáta. Na rozdiel od tradičných prístupov, ktoré vyžadovali manuálnu analýzu a interpretáciu, dokáže AI spracovať obrovské množstvá údajov, od digitálnych mikroskopických snímok, cez hmotnostné spektrá až po dáta získané sekvenačnými prístupmi, a využiť ich na presnú, rýchlu a automatizovanú diagnostiku. Prístupy založené na AI zároveň znižujú riziko chýb spôsobených ľudským faktorom, štandardizujú hodnotenie výsledkov a zvyšujú spoľahlivosť diagnostických výstupov aj v komplexných alebo polymikrobiálnych vzorkách.

AI dnes dopĺňa aj klinické rozhodovanie, napr. algoritmy strojového učenia (tzv. *machine learning*) umožňujú napríklad predikovať antimikrobiálnu rezistenciu na základe genetických alebo fenotypových dát, analyzovať a rekonštruovať prenosové reťazce infekcií, ako aj automatizovane hodnotiť rádiologické vyšetrenia pacientov s infekčnými ochoreniami, napríklad pri pneumónii alebo tuberkulóze. Tieto technológie tak prepájajú laboratórnu diagnostiku s klinickou praxou a vytvárajú nový, integrovaný prístup k diagnostike, liečbe a monitorovaniu pacienta.

7.1. Digitálna mikroskopia a analýza mikroskopických preparátov

AI modely, najmä konvolučné neurónové siete (CNN), sú schopné automatizovane analyzovať digitálne mikroskopické snímky a s vysokou presnosťou rozpoznávať morfologické znaky mikroorganizmov, ako sú tvar, farbenie, veľkosť či vnútorná štruktúra. Tieto systémy sa trénujú na tisícoch až miliónoch anotovaných obrazov, na základe ktorých vytvárajú robustné klasifikačné modely schopné spoľahlivej identifikácie patogénov. V praxi sú už dostupné konkrétne riešenia, ako napríklad *Findaureus*, ktorý automaticky rozpoznáva *Staphylococcus aureus* na imunofluorescenčne značených histologických rezoch. Systém eliminuje potrebu manuálneho nastavovania prahových hodnôt a optimalizuje spracovanie komplexných tkanivových vzoriek. Ďalším príkladom je *PhenoMatrix Colorimetric Detection Module*, ktorý deteguje *Streptococcus agalactiae* (skupina B) s citlivosťou porovnateľnou s molekulárnymi metódami, pričom výrazne zvyšuje laboratórnu produktivitu a minimalizuje riziko ľudskej chyby. V diagnostike tuberkulózy a iných mykobakterióz sa využíva systém *Metafer Neon*, ktorý pomocou automatizovaného skenovania preparátov a hĺbkového učenia (*deep learning*) výrazne zrýchľuje a zvyšuje citlivosť vyhodnotenia mikroskopických náterov farbených na

acidorezistentné baktérie. Navyše, kombinácia automatického skenovania a CNN skrátila čas analýzy jedného preparátu z niekoľkých minút na približne 10 sekúnd.

7.2. Zobrazovacie metódy

Zobrazovacie metódy, ako je röntgen a počítačová tomografia (*computer tommography*, CT), predstavujú neoddeliteľnú súčasť diagnostiky mnohých infekčných ochorení. Napriek ich vysokej diagnostickej výpovednej hodnote môže byť interpretácia obrazových nálezov do určitej miery subjektívna a závislá od skúseností rádiológa. Práve z tohto dôvodu sa v posledných rokoch do tejto oblasti čoraz intenzívnejšie integrujú algoritmy AI, ktoré umožňujú automatizovanú, presnú a reprodukovateľnú analýzu obrazových dát.

AI modely dokážu rozpoznať jemné obrazové vzorce, ktoré sú pre ľudské oko ťažko identifikovateľné. Na základe veľkého množstva trénovacích dát sa tieto algoritmy učia rozlišovať typické znaky infekcií, napríklad distribúciu infiltrátov, prítomnosť kavitácií, konsolidácií, nodulov alebo zhrubnutie pleury.

Najlepšie preskúmanou oblasťou využitia AI v spracovaní zobrazovacích dát je v rámci diagnostiky tuberkulózy a netuberkulóznych mykobakterióz. AI algoritmus dokázal identifikovať subtílne rozdiely v rozložení lézií, hrúbke stien kavít a prítomnosti satelitných nodulov, ktoré bývajú ťažko hodnotiteľné aj pre skúseného radiológa. Metódy využívajúce AI dokážu tiež s vysokou presnosťou rozlíšiť bakteriálnu pneumóniu od vírusovej, čo je v klinickej praxi mimoriadne dôležité pre rozhodovanie o antibiotickej liečbe. Pri COVID-19 sa modely hlbokého učenia používali na automatické rozpoznanie rozsahu postihnutia pľúc na CT, kvantifikáciu zápalových zmien a sledovanie odpovede na liečbu.

Napriek významným úspechom má využitie umelej inteligencie v zobrazovacej diagnostike aj svoje limitácie. Výkonnosť a spoľahlivosť algoritmov výrazne závisí od kvality, rozsahu a diverzity tréningových dát, keďže model natrénovaný na špecifickej populácii alebo na dátach z jedného typu zobrazovacieho zariadenia nemusí byť univerzálne použiteľný v iných klinických podmienkach. Ďalšou významnou výzvou je zabezpečenie klinickej interpretovateľnosti výsledkov, keďže AI síce dokáže s vysokou presnosťou predikovať pravdepodobnú diagnózu, no konečné rozhodnutie musí vždy potvrdiť lekár.

7.3. MALDI-TOF MS

Integrácia AI v rámci spracovania dát z MALDI-TOF MS predstavuje zásadný krok smerom k plne automatizovanej diagnostike mikroorganizmov. Tradičné spracovanie spektier vyžaduje manuálnu kontrolu kvality, interpretáciu výsledkov a porovnávanie s databázou referenčných profilov. Naproti tomu modely strojového učenia a hĺbkového učenia dokážu spracovať veľké množstvá dát simultánne a rozpoznávať detailné vzory

v proteínových spektrách, ktoré by boli mimo rozlišovacích schopností klasických algoritmov, a tým identifikovať mikroorganizmy s vyššou presnosťou až na úroveň poddruhu. Napríklad kombinácia MALDI-TOF MS so softvérom *ClinProTools* umožňuje presnú identifikáciu dvoch poddruhov *Staphylococcus aureus* - subsp. *aureus* a subsp. *anaerobius*.

CNN sa využívajú aj na automatické spracovanie spektier z polymikrobiálnych kultúr. Klasické systémy dokážu spoľahlivo identifikovať len dominantný druh, zatiaľ čo AI modely rozpoznajú a kvantifikujú aj zastúpené minoritné patogény. Modely typu CNN boli úspešne trénované na rozlíšenie spektrálnych „prekryvov“ medzi druhmi *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Enterobacter cloacae*.

AI výrazne rozširuje aj možnosti MALDI-TOF pri predikcii antibiotickej rezistencie. Na rozdiel od klasického prístupu, algoritmy strojového učenia dokážu automaticky identifikovať vzory v spektre, ktoré korelujú s prítomnosťou génov rezistencie. Modely trénované na rozsiahlych databázach spektier umožňujú predikovať prítomnosť karbapenemáz (gén *blaKPC*) u *Klebsiella pneumoniae* alebo meticilínovej rezistencie (*mecA*) u *Staphylococcus aureus* bez potreby genotypizácie už v priebehu 60 minút.

7.4. Molekulárno-genetické metódy

AI sa čoraz viac uplatňuje aj pri spracovaní a interpretácii výsledkov qPCR, ktorá patrí k základným nástrojom molekulárnej diagnostiky infekčných ochorení. Kým tradičná analýza vyžaduje manuálne nastavenie prahovej hodnoty a hodnotenie Ct (*cycle threshold*), algoritmy strojového učenia dokážu vyhodnocovať priebeh amplifikačných kriviek komplexnejšie a presnejšie. To znižuje riziko subjektívnych chýb a umožňuje spoľahlivú analýzu aj pri nízkej koncentrácii DNA. AI riešenia sa už používajú aj pri automatickej interpretácii multiplex PCR panelov pre respiračné infekcie, kde je možné z jednej vzorky detegovať vírus chrípky, RSV či SARS-CoV-2. Podobne umožňuje AI zvýšiť citlivosť metagenomických analýz, keďže umožňuje odlíšiť patogén od nešpecifickej flóry a určiť, ktorý mikroorganizmus má klinický význam. Takýto prístup sa osvedčil napríklad pri diagnostike tuberkulóznej meningitídy, kde klasické PCR testy často zlyhávajú pre nízku koncentráciu DNA.

V diagnostike sa uplatňujú aj AI-riadené biosenzory, ktoré analyzujú optické alebo elektrické signály generované biologickými reakciami a umožňujú súčasnú detekciu viacerých patogénov. V niektorých testoch založených na technológii LAMP umelá inteligencia spracúva fluorescenčný signál v reálnom čase, sleduje priebeh amplifikácie nukleovej kyseliny a automaticky vyhodnocuje výsledok bez potreby zásahu odborného personálu.

AI umožňuje tiež spracovať veľké množstvo údajov pochádzajúcich z molekulárnych analýz a kombinovať ich s klinickými parametrami pacienta, ako sú vek,

pohlavie, komorbidity, imunitný stav či hodnoty iných laboratórnych parametrov. Pomocou algoritmov strojového učenia je potom možné vytvárať prediktívne modely, ktoré odhadujú závažnosť ochorenia, riziko komplikácií alebo úspešnosť liečby. Hlavný potenciál tohto prístupu spočíva v podpore personalizovanej medicíny, včasnej stratifikácii rizikových pacientov a v optimalizácii terapeutických rozhodnutí už v skorých fázach ochorenia.

V súčasnosti sa čoraz častejšie využívajú sekvenačné technológie na rýchlu detekciu genetických determinantov antimikrobiálnej rezistencie. Hoci je prostredníctvom týchto prístupov možné identifikovať známe gény rezistencie alebo mutácie v cieľových génoch, funkčný význam mnohých genetických variantov zatiaľ nie je jednoznačne objasnený. Využitím algoritmov strojového učenia je však možné odhaľovať skryté vzorce v genetickej informácii, ktoré sú charakteristické pre jednotlivé mechanizmy rezistencie. V praxi sa ukázalo, že AI dokáže spoľahlivo predpovedať rezistenciu u viacerých významných patogénov. Pri *Escherichia coli* sa podarilo vytvoriť tzv. mapu génov rezistencie, ktorá na základe genomických dát automaticky identifikuje známe aj nové mechanizmy antibiotickej rezistencie. U *Klebsiella pneumoniae* boli pomocou algoritmov typu *XGBoost* a CNN s vysokou presnosťou predpovedané minimálne inhibičné koncentrácie pre viac ako 20 antibiotík, pričom model dokázal zároveň odlíšiť vysoko virulentné kmene. Podobné prístupy sa uplatnili aj pri *Mycobacterium tuberculosis*, kde systém Treesist-TB založený na rozhodovacích stromoch identifikoval mutácie spojené s rezistenciou voči rifampicínu, izoniazidu či fluorochinolónom presnejšie ako konvenčné bioinformatické nástroje.

Zhrnutie kapitoly

AI zásadným spôsobom mení paradigmu diagnostiky infekčných ochorení tým, že umožňuje rýchlu, presnú a vysoko automatizovanú interpretáciu komplexných laboratórnych, obrazových a genomických údajov. Jej najväčším prínosom je schopnosť spracovať veľké objemy dát, identifikovať subtílne diagnostické vzorce a znižovať chybovosť, čo výrazne urýchľuje klinické rozhodovanie. Integrácia AI do digitálnej mikroskopie, zobrazovacích metód, MALDI-TOF MS a molekulárnej diagnostiky tak vytvára nové štandardy pre rýchlu identifikáciu patogénov, predikciu antibiotickej rezistencie a personalizované terapeutické odporúčania.

Súčasné limity však zdôrazňujú potrebu obozretnosti, nakoľko výkonnosť modelov závisí od kvality tréningových dát, štandardizácia medzi laboratóriami je nedostatočná, interpretovateľnosť algoritmov je obmedzená a generalizovateľnosť výsledkov mimo pôvodných dátových súborov zostáva výzvou. AI tak musí byť chápaná ako podporný nástroj, nie ako autonómny diagnostický prístup.

Budúci rozvoj smeruje k integrácii multimodálnych dát (mikroskopických, omických, klinických atď.) v jedinom prediktívnom modeli, ktorý bude schopný

poskytovať komplexné, dynamické a individualizované diagnostické odporúčania v reálnom čase. Rozšírenie štandardizovaných databáz a robustejšie algoritmy umožnia posun smerom k plne prepojenej, dátovo riadenej diagnostike a skutočnej personalizovanej medicíne v infekčnej oblasti.

8. POUŽITÁ LITERATÚRA

Connie R. Mahon, Donald C. Lehman, Textbook of Diagnostic Microbiology. Seventh edition. Elsevier; 2023.

Capelo Martinez JL, Igrejas G. Antibiotic Drug Resistance. John Wiley; 2020.

Elena Nováková, Jana Kompaníková, Martina Neuschlová, Anna Porubská: Lekárska mikrobiológia. Multimediálna podpora výučby klinických a zdravotníckych disciplín :: Portál Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského [online] , [cit. 01. 10. 2025]. Dostupný z WWW: https://portal.jfmed.uniba.sk//clanky.php?aid=203. ISSN 1337-7396.

Elena Nováková, Jurina Sadloňová, Jana Kompaníková, Martina Neuschlová, Vladimíra Sadloňová: Mikrobiológia – princípy a interpretácia laboratórnych vyšetrení 1. časť. Multimediálna podpora výučby klinických a zdravotníckych disciplín :: Portál Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského [online] , [cit. 01. 10. 2025]. Dostupný z WWW: https://portal.jfmed.uniba.sk//clanky.php?aid=356. ISSN 1337-7396.

Florio W, Baldeschi L, Rizzato C, Tavanti A, Ghelardi E, Lupetti A. Detection of antibiotic-resistance by maldi-tof mass spectrometry: an expanding area. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:572909. doi:10.3389/fcimb.2020.572909

Goering RV, Zuckerman MA, Dockrell HM, Chiodini PL, Mims CA. Mims' Medical Microbiology and Immunology. Seventh edition. Elsevier; 2025.

Greenwood D, Slack RCB, Barer MR, Irving WL. Medical Microbiology: A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control. With Student Consult Online Access. 18th ed. Elsevier Health Sciences UK; 2012.

Gronthoud FA, ed. Practical Clinical Microbiology and Infectious Diseases: A Hands-on Guide. First edition published 2021. CRC Press, Taylor & Francis Group; 2021.

Juraj Mokrý, Igor Porvazník, Juraj Váňa: Vybrané kapitoly z klinickej farmakológie: Antimikrobiálne látky I. - farmakológia. Multimediálna podpora výučby klinických a zdravotníckych disciplín :: Portál Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského [online] , [cit. 01. 10. 2025]. Dostupný z WWW: https://portal.jfmed.uniba.sk//clanky.php?aid=219. ISSN 1337-7396.

Persing DH, ed. Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice. 3rd ed. ASM Press; 2016.

Ryan KJ, ed. Sherris & Ryan's Medical Microbiology. Eighth edition. McGraw Hill; 2022.

Sulaiman IM, ed. Diagnosis of Pathogenic Microorganisms Causing Infectious Diseases. First edition. CRC Press; 2024.

Tille PM. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. Fifteen edition. Elsevier; 2021.

WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024 : Bacterial Pathogens of Public Health Importance, to Guide Research, Development, and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance. World Health Organization; 2024.

9. SPRÁVNE ODPOVEDE

KAPITOLA 1. – 1B, 2C, 3B, 4C, 5C, 6B, 7B, 8D, 9B, 10B

KAPITOLA 2. – 1B, 2A, 3D, 4B, 5C, 6D, 7A

KAPITOLA 3. – 1D, 2C, 3B, 4B, 5A, 6D, 7C, 8B, 9A, 10B

KAPITOLA 4. – 1A, 2B, 3D, 4C, 5B, 6A, 7B, 8D, 9C, 10C

KAPITOLA 5. – 1C, 2D, 3A, 4B, 5A, 6B, 7C, 8A, 9C, 10D

KAPITOLA 6. - 1B, 2C, 3D, 4A, 5C, 6D, 7B