

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko – technologická
Katedra biologických a biochemických věd

**Onemocnění způsobená *Ureaplasma urealyticum* a *Ureaplasma parvum*,
laboratorní diagnostika a terapie**

Autor práce: SIMONA PAVLÍKOVÁ

Vedoucí práce: RNDr. Petra Mosio, Ph.D.

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 20. 6. 2012

Simona Pavlíková

Ráda bych zde poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Petře Mosio, Ph.D., za cenné připomínky a rady i za čas, který mi při konzultacích a při řešení dané problematiky ochotně věnovala.

ANOTACE

Ureaplasma urealyticum a *Ureaplasma parvum* jsou podmíněně patogenní mikroorganismy vyskytující se v urogenitálním traktu zdravých mužů a žen. Stále častěji jsou však spojovány s řadou infekčních onemocnění urogenitálního traktu. Bakalářská práce se kromě patogenity ureaplasmat zabývá také jejich laboratorní diagnostikou, a to zejména přímým průkazem, který je vzhledem k jejich kultivační náročnosti obtížný. Práce zahrnuje také informace o doporučené terapii ureaplasmových infekcí a citlivosti obou druhů ureaplasmat na vybraná antibiotika.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ureaplasma urealyticum, *Ureaplasma parvum*, kultivační vyšetření, terapie, testování citlivosti

TITLE

Diseases caused by *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*, laboratory diagnosis and therapy.

ANNOTATION

Ureaplasma urealyticum and *Ureaplasma parvum* are opportunistic pathogens commonly isolated from urogenital tract of healthy women and men. However, they are associated with various infectious diseases of urogenital tract with increasing frequency. This work is focused not only on pathogenic potential of ureaplasmas, but also on their laboratory diagnosis. Particularly the direct identification is somewhat problematic due to their high cultivation requirements. Moreover, information about recommended therapy and susceptibility of both ureaplasma species against selected antimicrobial agents are also part of this work.

KEYWORDS

Ureaplasma urealyticum, *Ureaplasma parvum*, cultivation, therapy, susceptibility testing

OBSAH

1 ÚVOD	8
1.1 HISTORIE	9
1.2 TAXONOMIE	9
1.3 MORFOLOGIE BUNĚK.....	10
1.4 MNOŽENÍ UREAPLASMAT	11
1.5 ANTIGENNÍ STRUKTURA A FAKTORY VIRULENCE	11
1.6 GENETICKÁ VÝBAVA	12
1.7 ONEMOCNĚNÍ VYVOLANÁ UREAPLASMATY	13
1.7.1 Výskyt a způsob přenosu	13
1.7.2 Urogenitální infekce	14
1.7.3 Extragenitální infekce	15
1.9 TERAPIE	16
1.10 PRŮKAZ UREAPLASMAT	19
1.10.1 Vyšetřovaný materiál	19
1.10.2 Kultivace	19
1.10.3 Komerční sestavy.....	22
1.10.4 Molekulárně biologické metody	23
1.10.5 Sérologická typizace	27
1.10.6 Testování citlivosti na antibiotika	27
1.10.7 Nepřímá diagnostika	30
2 ZÁVĚR	32
LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	34

SEZNAM ZKRATEK

bp	páry bazí (z angl. base pair)
CNS	centrální nervová soustava
ELISA	enzymová imunoanalýza (z angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
MBA	multiple-banded antigen
MIC	minimální inhibiční koncentrace (z angl. minimal inhibitory concentration)
NGU	negonokoková uretritida
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PPLO	organismy podobné pleuropneumonii (z angl. pleuropneumonia-like organisms)
<i>U.</i>	<i>Ureaplasma</i>

1 ÚVOD

Ureaplasmata patří k nejmenším bakteriím schopným samostatného života na bezbuněčných médiích. Ačkoliv bývají izolována z urogenitálního traktu zdravých mužů a žen, stále častěji jsou uváděna do souvislosti s řadou infekčních onemocnění tohoto traktu. Vzácněji mohou způsobovat také extragenitálně lokalizované infekce, a to zejména u novorozenců a osob s oslabenou imunitou.

Ureaplasma urealyticum a *Ureaplasma parvum* mohou být u žen původci endometritidy, bakteriální vaginózy a zánětlivého onemocnění pánve. U těhotných žen může kolonizace genitálního traktu ureaplasmaty vést ke komplikacím, jako jsou předčasné porody, potraty a nízká porodní váha novorozence. U mužů bývají tyto bakterie uváděny v souvislosti s prostatitidami a negonokokovými uretritidami. V posledních letech se studuje také jejich role při rozvoji neplodnosti u mužů i žen.

Průkaz ureaplasmat v klinickém materiálu je založen zejména na kultivačním vyšetření, které je však komplikováno vysokými kultivačními nároky této skupiny bakterií. Z dalších metod přímého průkazu se uplatňují molekulárně biologické metody a serologická typizace. K nepřímému průkazu lze využít např. metabolismus inhibiční test, nepřímou imunofluorescenci nebo metodu ELISA.

Vzhledem k přirozené rezistenci ureaplasmat na beta-laktamová antibiotika jsou lékem volby tetracyklinová nebo fluorochinolonová antibiotika.

1.1 HISTORIE

„T-mykoplasmata“ poprvé vykultivovali Shepard a kol. v roce 1954 z exsudátu z uretry pacienta s negonokokovou uretritidou. Písmeno „T“ použité v názvu odpovídalo anglickému tiny – droboučkový, což vycházelo z malé velikosti kolonií narostlých na pevných půdách. V roce 1974 navrhli Shepard a kol. zařazení těchto bakterií do nového rodu, rodu *Ureaplasma* (*U.*), a jediný tehdy známý druh izolovaný z člověka pojmenovali *U. urealyticum* (Shepard a kol., 1974).

Dříve byl druh *U. urealyticum* na základě antigenní odlišnosti rozdělen do 14 sérovarů, které byly zařazeny ke dvěma odlišným biovarům. Biovar 1, označovaný jako *parvo*, zahrnoval sérotypy 1, 3, 6 a 14. Ostatní sérotypy (2,4,5,7,8,9,10,11,12 a 13) patřily do biovaru 2, označovaného jako T960^T (Kong a kol., 1999; Robertson a kol., 2002).

Na základě fenotypové a genotypové analýzy navrhli v roce 2002 Robertson a kol. rozdělení druhu *U. urealyticum* na dva samostatné druhy *U. urealyticum* (původně biovar T960^T) a *U. parvum* (původně biovar *parvo*) (Robertson a kol., 2002).

1.2 TAXONOMIE

Třída: *Mollicutes*

řád: *Mycoplasmatales*

čeleď: *Mycoplasmataceae*

rod: *Ureaplasma*

druh: *U. urealyticum*

U. parvum

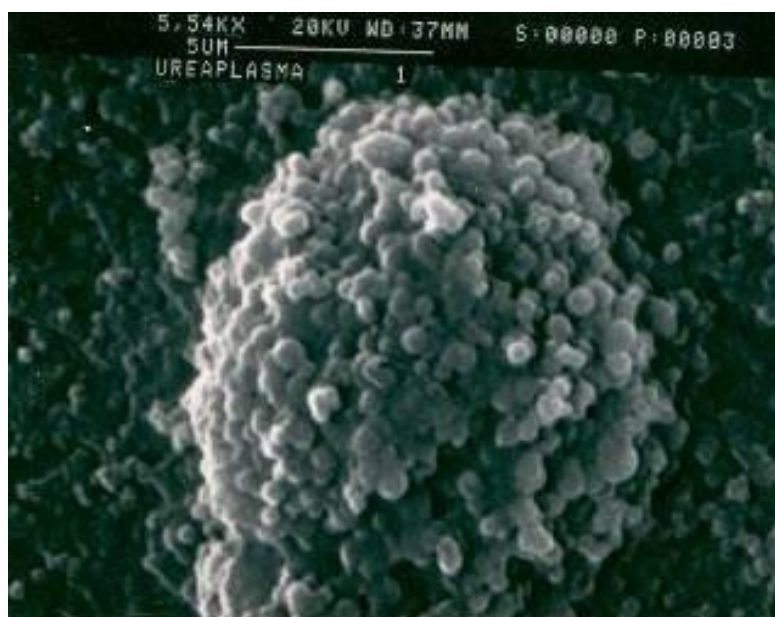
Název *Mollicutes*, vychází z lat. *mollis* – měkký a *cutis* – kůže, a vyjadřuje tak základní charakteristiku všech zástupců této třídy, a to neschopnost tvořit pevnou buněčnou stěnu (Razin a kol., 1998).

Rod *Ureaplasma* se od ostatních rodů třídy *Mollicutes* liší produkcí ureasy (Greenwod a kol., 1999). V současné době zahrnuje 7 druhů, z nichž pro člověka jsou nejvýznamnější druhy *U. urealyticum* a *U. parvum* (Euzéby, 2012).

1.3 MORFOLOGIE BUNĚK

Morfologie buněk ureaplasmat je závislá na stádiu růstového cyklu i kultivačních podmínkách. Vzhledem k absenci buněčné stěny je tvar jejich buněk značně pleomorfní. Nejčastěji se jedná o koky (průměr 0,5 μm), ale mohou mít také vzhled kokobacilů i kratších vláken (viz obrázek 1). Dlouhá vlákna nebo řetízky koků charakteristické pro buňky mykoplasmat v logaritmické fázi růstu nebyly u ureaplasmat popsány (Razin a kol. 1977; Greenwod a kol., 1999).

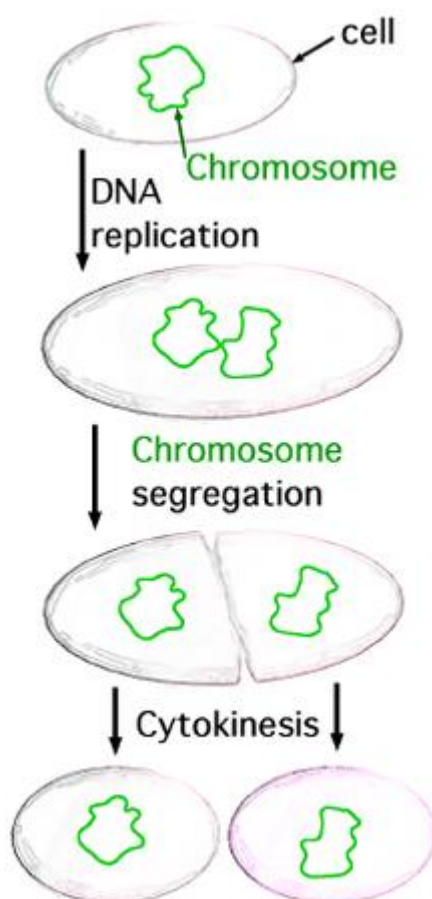
Ureaplasmovou buňku ohraničuje pouze pružná třívrstevná membrána, která se skládá ze dvou bílkovinných a jedné vrstvy obsahující fosfolipidy a cholesterol. Ten představuje významnou složku membrány, protože zajišťuje její osmotickou stabilitu. Membránové proteiny mají nejen katalytickou a stavební funkci, ale zároveň patří k nejvýznamnějším antigenním strukturám ureaplasmat (Razin a kol., 1998).



Obrázek 1: Buňka *U. urealyticum* na snímku z elektronového mikroskopu (Glass a kol., 2000).

1.4 MNOŽENÍ UREAPLASMAT

Ureaplasmata se množí stejně jako ostatní bakterie binárním dělením, kdy dělení cytoplazmy následuje po replikaci genomu. V místech mezi dvěma genomy se cytoplazma oddělí zaškrcením a vytváří se korálkovité řetízky, které podléhají další fragmentaci, až vzniknou jednotlivé buňky (viz obrázek 2). Celý cyklus se pak znovu opakuje (Greenwood a kol., 1999).



Obrázek 2: Množení mykoplasmat (Schmidt, 2006).

1.5 ANTIGENNÍ STRUKTURA A FAKTORY VIRULENCE

Hlavním faktorem virulence *U. urealyticum* i *U. parvum* jsou druhově i sérotypově specifické MB antigeny (z angl. multiple-banded). Jedná se o antigeny lipoproteinového charakteru, které jsou hlavními imunogeny a jsou také nejvýznamnější z hlediska interakce s hostitelskými buňkami. Antigenní variabilita MB antigenů může být jedním z mechanismů, které umožňují

ureaplasmatům unikat imunitnímu systému hostitele (Kong a kol., 1999; Glass a kol., 2000; Pitcher a kol., 2001; Viscardi a Hasday, 2009; Waites a kol., 2009a; Garrity a kol., 2010).

Dalším faktorem virulence ureaplasmat je enzym ureasa. Hydrolyzou močoviny získává *U. urealyticum* 95 % svého ATP. Patogenní potenciál zmíněného enzymu spočívá v produkci amoniaku (viz rovnice), který může mít lokální cytotoxický účinek (Glass a kol., 2000; Viscardi a Hasday, 2009; Waites a kol., 2009a).



IgA proteasa rozkládá hlavní složku slizniční imunity - IgA, a tak usnadňuje průnik ureaplasmat do dolní části genitálního traktu (Glass a kol., 2000; Viscardi a Hasday, 2009).

Ureaplasmata mohou produkovat fosfolipasy odlišné stavby, než jsou fosfolipasy ostatních bakterií. Tyto enzymy mohou rozkládat fosfolipidy v membránách hostitelských buněk a tak usnadňovat přežívání ureaplasmat v genitálním traktu. Je zvažována také jejich role v rozvoji předčasného porodu, pravděpodobně ovlivněním biosyntézy prostaglandinů (Glass a kol., 2000; Viscardi a Hasday, 2009).

Hemolyzin, kódovaný genem *hlyA*, je dalším faktorem virulence *U. urealyticum*. Na rozdíl od hemolyzinů mykoplasmat, má tento hemolyzin enzymatický charakter a není inhibován katalasou. Mechanismus jeho účinku spočívá v tvorbě pórů v buněčných membránách hostitelských buněk (Glass a kol., 2000).

Ureaplasmata jsou výborně adaptována na parazitický způsob života. Odčerpávání živin, které umožňuje úzký kontakt s hostitelskou buňkou, je dalším faktorem virulence.

1.6 GENETICKÁ VÝBAVA

Ureaplasmata mají jeden z nejmenších genomů mezi bakteriemi, schopnými samostatného života mimo hostitelskou buňku. Genom *U. urealyticum* se pohybuje v rozmezí ~840-1140 kbp, zatímco velikost genomu *U. parvum* je ~760 kbp (Glass a kol., 2000; Robertson a kol., 2002).

Genom je tvořen cirkulárním chromozómem s obsahem guaninu a cytosinu v rozmezí 25-28 mol %, v závislosti na druhu a sérotypu ureaplasmat. Genom *U. parvum* obsahuje 613 protein-kódujících sekvencí a 39 genů kódujících RNA a je považován za druhý nejmenší genom hned po *Mycoplasma genitalium* (Glass a kol., 2000; Robertson a kol., 2002).

Na základě zastoupení guaninu a cytosinu v genomu mykoplasmat a ureaplasmat byla vyslovena teorie o jejich příbuznosti s grampozitivními mikroorganismy, konkrétně s klostridiemi (Glass a kol., 2000; Razin a Herrmann, 2002).

1.7 ONEMOCNĚNÍ VYVOLANÁ UREAPLASMATY

1.7.1 Výskyt a způsob přenosu

Ureaplasmata se vyskytují v dutině ústní, respiračním a urogenitálním traktu lidí a různých druhů zvířat (primátů, skotu, hlodavců, koní, prasat, psů, koček a dalších) (Euzéby, 2012).

U člověka se vyskytují zejména druhy *U. parvum* a *U. urealyticum*, přičemž první zmíněný je izolován mnohem častěji. Vzhledem k tomu, že mohou být součástí mikroflóry genitálního traktu zdravých lidí, je jejich patogenní potenciál stále diskutován. V posledních letech jsou však stále častěji spojovány s řadou akutních i chronických infekcí urogenitálního traktu. Zvažuje se také jejich role v rozvoji neplodnosti. Velmi časté jsou studie popisující extragenitálně lokalizované infekce vyvolané *U. parvum* a *U. urealyticum*, a to zejména u novorozenců a osob s oslabenou imunitou (Taylor-Robinson, 1996; Viscardi a Hasday, 2009; Waites a kol., 2009a).

Ureaplasmata jsou přenášena přímým kontaktem (pohlavní styk, různé sexuální praktiky), vertikálně z matky na dítě (během těhotenství nebo při porodu), případně nosokomiálním přenosem při transplantacích (Imudia a kol., 2008). Vertikální přenos je nepřímo úměrný gestačnímu stáří plodu a jeho riziko se zvyšuje s prasknutím plodových obalů (Viscardi a Hasday, 2010; Waites a kol., 2009a).

Zvýšené riziko infekcí ureaplasmaty úzce souvisí se sexuální aktivitou a také věkem. Zhu a kol. (2012) popisuje nejčastější výskyt u žen ve věku

16-35 let. Doubek a Petrovová (2006), Waites a kol. (2009a) a Rampersaud a kol. (2012) uvádějí výskyt ureaplasmat u 40-80 % sexuálně aktivních žen. Také výskyt u těhotných žen není výjimečný. Kacerovský a kol. (2009) popisují výskyt *U. urealyticum* u 17 % žen s normálním průběhem těhotenství. Výskyt ureaplasmat je častější u žen než u mužů. Zeighami a kol. (2009) zaznamenali u zdravých mužů 3% výskyt *U. urealyticum*.

1.7.2 Urogenitální infekce

Ureaplasmata byla izolována ze zánětlivých změn na vejcovodech u pacientek se zánětlivým onemocněním pánve. Avšak vzhledem k tomu, že se obvykle vyskytují ve směsi s dalšími patogeny, je jejich role při rozvoji tohoto onemocnění diskutabilní (Taylor-Robinson, 1996). Podobně je na tom hodnocení významu ureaplasmat v problematice bakteriální vaginózy. Rovněž v tomto případě bývají ureaplasmata izolována ve směsi s *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., anaerobními gramnegativními tyčinkami a *Mycoplasma hominid* (Taylor-Robinson, 1996; Waites a kol., 2009a). Doubek a Petrovová (2006) studovali výskyt *U. urealyticum* u pacientek s chronickým poševním výtokem. Tuto bakterii izolovali u 49 % žen, z toho ve 29,9 % se jednalo o monoinfekci a 1,9 % představovalo smíšenou infekci s *Mycoplasma hominis*. Ve zbylých případech bylo ureaplasma vykultivováno spolu s dalšími mikroorganismy, nejčastěji se *Streptococcus agalactiae* a koagulasa-negativními stafylokoky.

Kolonizace poševní sliznice těhotných žen ureaplasmaty může vést k řadě komplikací, jako jsou chorioamnionitidy, předčasné porody, narození mrtvého plodu, potraty, horečky po porodu nebo potratu a endometritidy (Taylor-Robinson, 1996; Waites a kol., 2009a; Larsen a Hwang, 2010; Viscardi a Hasday, 2010). Waites a kol. (2009a) a Viscardi a Hasday (2010) uvádějí, že ureaplasmata jsou nejčastěji se vyskytujícími mikroorganismy v plodové vodě a placentě žen, které předčasně porodily. Autoři popisují izolaci ureaplasmat již v 16. týdnu těhotenství, přičemž infekce může být bezpříznaková a k porodu může dojít až za několik týdnů. Patogeneze rozvoje předčasného porodu zřejmě spočívá v aktivaci leukocytů a tvorbě prozánětlivých cytokinů a prostaglandinů E_2 a $F_{2\alpha}$.

V posledních letech se stále častěji studuje význam ureaplasmat v rozvoji neplodnosti, zatím však bez jednoznačného závěru. Rodriguez a kol. (2001) uvádějí pozitivní záchyt ureaplasmat u 23,5 % osob vyšetřovaných pro neplodnost. Taylor-Robinson (1996) a Zeighami a kol. (2009) popisují negativní vliv *U. urealyticum* na objem, viskozitu a pH ejakulátu a také na pohyblivost a koncentraci spermií u neplodných mužů. Naproti tomu jiné studie spojení mezi výskytem ureaplasmat a neplodností neprokázaly (Gump a kol., 1984; Nagata a kol., 1979).

Vzhledem ke své ureasové aktivitě se mohou ureaplasmata podílet na vzniku infekčních močových kamenů. Taylor-Robinson (1996) uvádí častější výskyt ureaplasmat v moči a močových kamenech pacientů s infekčními močovými kameny než u pacientů s metabolickými kameny.

U mužů jsou ureaplasmata spojována s negonokokovými uretritidami (NGU) a prostatitidami (Taylor-Robinson, 1996; Yoshida a kol., 2003). Kilic a kol. (2004) zaznamenali pozitivní záchyt *U. urealyticum* u 48 % mužů s NGU, z toho 26 % kmenů bylo izolováno v čisté kultuře a zbývajících 22 % ve směsi s *Chlamydia trachomatis* a *Mycoplasma hominis*. Akutní uretritida může vést k zánětům prostaty nebo nadvarlat (Taylor-Robinson, 1996).

1.7.3 Extragenitální infekce

Ureaplasmata mohou způsobovat respirační infekce novorozenců (pneumonii, chronické plicní onemocnění, bronchopulmonární dysplazii), a to zejména u těch předčasně narozených s nízkou porodní hmotností (Katz a kol., 2005; Waites a kol., 2009a; Larsen a Hwang, 2010; Viscardi a Hasday, 2010). Taylor-Robinson (1996) uvádí, že novorozenci s porodní hmotností pod 1000 g, u kterých jsou izolována ureaplasmata z tracheálního aspirátu, mají dvakrát vyšší pravděpodobnost úmrtí než novorozenci se stejnou porodní hmotností, kteří infikováni nejsou. Viscardi a Hasday (2010) popisují dokonce 4,2krát vyšší pravděpodobnost úmrtí. Cultrera a kol. (2006) uvádějí *U. parvum* v souvislosti s rozvojem syndromu dechové tísně u předčasně narozených novorozenců.

U předčasně narozených dětí s probíhající respirační infekcí nebo hydrocefalem mohou ureaplasmata pronikat do CNS a způsobovat meningitidy. Ty mohou mít lehký, subklinický průběh, nebo může naopak dojít k vážnému neurologickému poškození (Taylor-Robinson, 1996). Viscardi a kol. (2008) uvádí pozitivní záchyt ureaplasmat, zejména *U. parvum*, z hemokultury a/nebo likvoru 23,6 % novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností, u kterých byla diagnostikována meningitida. Autoři dále upozorňují na zvýšené riziko rozvoje intraventrikulární hemorrhagie u těchto novorozenců. U předčasně narozených dětí jsou popisovány také sepse vyvolané *U. parvum* (Cultrera a kol., 2006; Larsen a Hwang, 2010).

U osob s hypogamaglobulinemií jsou ureaplasmata spojována s infekční artritidou. Bakterie jsou izolovány z kloubů mnohdy ve velkém množství a i přes intenzivní terapii antibiotiky a protizánětlivými léky onemocnění přetrvává řadu měsíců. Jsou popisovány také případy artritid u imunokompetentních jedinců, které se rozvinuly jako komplikace genitálních infekcí (Taylor-Robinson, 1996).

Minion a Jarvill-Taylor (1994) uvádějí 40% výskyt *U. parvum* u žen po transplantaci ledvin, zatímco u žen v kontrolní skupině byl zaznamenán pouze 27,5% výskyt.

1.9 TERAPIE

Léčba infekcí způsobených genitálními ureaplasmaty spočívá zejména v podávání antibiotik, a to zejména tetracyklinové, makrolidové a chinolonové řady. Vzhledem k tomu, že se většinou jedná o antibakteriální látky s bakteriostatickým účinkem, je pro úspěšnost léčby nezbytný plně funkční imunitní systém hostitele (Plettenberg a kol., 2010). Pokud léčba není úspěšná a potíže stále přetrvávají, je nutné provést kontrolní kultivační vyšetření. Následná terapie by měla být prodloužena na dvojnásobnou dobu a mělo by být podáváno antibiotikum jiné řady než při předchozí terapii (Doubek a Petrovová, 2006). Přirozená rezistence ureaplasmat na beta-laktamová antibiotika souvisí s jejich neschopností tvořit pevnou buněčnou stěnu.

Tetracyklinová antibiotika, která jsou lékem první volby při terapii ureaplastických infekcí, inhibují proteosyntézu v bakteriálních buňkách. Podávání doxycyklinu je vhodné zejména k terapii smíšených ureaplastických, mykoplastických a/nebo chlamydiových infekcí (Doubek a Petrovová, 2006)

Stále častěji se však objevují informace o rostoucí rezistenci *U. urealyticum* k tetracyklinu i doxycyklinu (Bébear a kol., 2000). Vznik rezistence je podmíněn získáním genu *tetM*, který se přenáší mezi bakteriemi v urogenitálním traktu (Blanchard a kol., 1992; Kenny a Cartwright, 1994).

Antibiotika makrolidové řady jsou další možností využitelnou k terapii ureaplastických infekcí, a to zejména u těhotných žen a novorozenců. Informace o rezistenci ureaplastických jsou rozporuplné, což je pravděpodobně způsobeno skutečností, že kyselé pH nutné pro jejich kultivaci ovlivňuje *in vitro* aktivitu erytromycinu. Uváděné hodnoty minimálních inhibičních koncentrací (MIC, z angl. minimal inhibitory concentration) pro erytromycin se pohybují v rozmezí 0,02-4 µg/ml. Rezistence k makrolidům je založena na aktivním odčerpávání antibiotika z buňky, tzv. efluxu (Peyere a kol., 2007). Doubek a Petrovová (2006) uvádějí použití klarithromycinu u pacientů s alergií či nesnášenlivostí doxycyklinu. Terapie tímto antibiotikem byla úspěšná u 85,7 % pacientů zařazených do studie. Plettenberg a kol. (2010) doporučují 7denní podávání azithromycinu.

Chinolony, a zejména fluorchinolony, představují vhodnou alternativu pro terapii ureaplastických infekcí. Jedná se o baktericidní antibiotika, která mohou pronikat přes hematoencefalickou bariéru a lze je použít u infekcí CNS. Podávání chinolonů je však kontraindikováno u těhotných žen a dětí. Kilic a kol. (2004) a Plettenberg a kol. (2010) doporučují ofloxacin jako lék první volby k empirické terapii ureaplastických infekcí.

Hodnoty účinných koncentrací vybraných antibiotik, uváděných různými autory, informuje tabulka 1.

Tabulka 1: Minimální inhibiční koncentrace vybraných antibiotik inhibující růst 90 % kmenů *U. urealyticum* publikované různými autory, uváděné v mg/l

Antibiotikum	1*	2	3*	4	5	6
Tetracykliny						
Doxycyklin	0,25	0,125	0,25	16	1	0,25
Minocyklin	NT	NT	NT	NT	2	NT
Tetracyklin	NT	0,125	NT	NT	2	2
Makrolidy						
Azitromycin	0,25	14	NT	4	2	4
Erytromycin	0,5	12	16	NT	8	8
Klaritromycin	0,03	12	NT	NT	0,5	1
Roxithromycin	0,25	12	NT	NT	4	4
Chinolony						
Ciprofloxacin	NT	0,94	NT	NT	4	NT
Levofloxacin	0,5	NT	2	1	NT	2
Ofloxacin	2	0,94	2	NT	2	NT
Linkosamidy						
Klindamicin	NT	NT	NT	NT	8	NT
Ostatní						
Linezolid	NT	NT	NT	>256	NT	NT

Legenda:

NT – netestováno

* - kmeny *U. urealyticum* citlivé k doxycyklinu

1 - Bébéar a kol. (2000) - testováno bujónovou diluční metodou

2 - Cakan a kol. (2003) - testováno agarovou diluční metodou a E-testem

3 - Bébéar a kol. (2008) - testováno bujónovou diluční metodou

4 - Waites a kol. (2009b) - testováno mikrodiluční metodou

5 - Krausse a Schubert (2010) – agarovou diluční metodou

6 - Samra a kol. (2011) - testováno mikrodiluční metodou

1.10 PRŮKAZ UREAPLASMAT

Zlatým standardem pro přímý průkaz ureaplasmat jsou stále kultivační techniky. V poslední době se stále častěji využívají také molekulárně biologické metody, zejména polymerázová řetězová reakce. K identifikaci ureaplasmat lze využít i sérologickou typizaci.

1.10.1 Vyšetřovaný materiál

K vyšetření se odebírá klinický materiál podle charakteru a průběhu infekce, nejlépe před zahájením antibiotické terapie.

U žen se jedná nejčastěji o výtěry z pochvy, cervixu nebo vyústění močové trubice. Lze vyšetřovat také moč a plodovou vodu. U mužů se vyšetřují výtěry z uretry, ejakulát, sekret prostaty, případně moč. U extragenitálních infekcí se odebírá krev, kloubní tekutina, mozkomíšní mok nebo bioptický materiál (Taylor-Robinson a McCormack, 1980).

Vyšetřovaný materiál je vhodné zpracovat bezprostředně po odběru. Pokud to není možné, je nutné použít transportní médium a uchovávat vzorky při chladničkové teplotě.

1.10.2 Kultivace

Ureaplasmata patří k nejmenším mikroorganismům rostoucím na bezbuněčných médiích. Vzhledem k omezené biosyntetické aktivitě se však jedná o bakterie kultivačně velmi náročné.

Ke kultivaci ureaplasmat se používají tzv. PPLO (z angl. Pleuro-pneumonia-like organisms) agary a bujóny. Jedná se o kultivační média obsahující infuzi z hovězích srdcí, kvasničný extrakt jako zdroj růstových faktorů a koňské sérum, které je zdrojem cholesterolu, nasyčených a nenasycených mastných kyselin (Euzéby, 2012).

Pro zajištění dostatečné selektivity se do kultivačních půd přidávají inhibiční látky potlačující růst nežádoucích mikroorganismů. Z antibiotik je to nejčastěji ampicilin. Vzhledem k tomu, že ureaplasmata netvoří buněčnou stěnu, jsou k beta-laktamovým antibiotikům přirozeně rezistentní. Selektivní účinek ampicilinu

je posílen přidáním linkomycinu, ev. amfotericinu B, který inhibuje růst kvasinek a plísní (Taylor-Robinson, 1993).

Kultivační média jsou dále obohacena močovinou, kterou ureaplastmata využívají jako zdroj energie, a fenolovou červení. Optimální pH je $6,0 \pm 0,5$ (Euzéby, 2012). Půdy dále obsahují síran manganatý, který *U. urealyticum* redukuje na burel. Burel precipituje na koloniích, ty pak mají tmavě hnědou barvu a lépe se pozorují.

Příprava PPLO bujónu používaného ke kultivaci *U. urealyticum* v mikrobiologické laboratoři na Katedře biologických a biochemických věd byla následující:

4,2 g Difco™ PPLO broth se rozpustí ve 140 ml redestilované vody a sterilizuje 15 minut při teplotě 121°C. Po vychladnutí přibližně na teplotu 50 – 60 °C se přidají další suplementy:

- 20 ml kvasničného extraktu
- 40 ml koňského séra
- 1 ml ampicilinu (200 mg/ml)
- 400 µl 40% urey
- 400 µl fenolové červeně
- 400 µl amfotericinu B (1 mg/ml)
- 800 µl linkomycinu (256 mg/l).

Po přidání všech uvedených složek se pH upraví 10% NaOH nebo HCl tak, aby se konečné pH roztoku pohybovalo v rozmezí 5,8-6,2. Roztoky PPLO bujónu se skladují při teplotě 4°C maximálně měsíc.

Příprava PPLO agaru používaného ke kultivaci *U. urealyticum* v mikrobiologické laboratoři na Katedře biologických a biochemických věd byla následující:

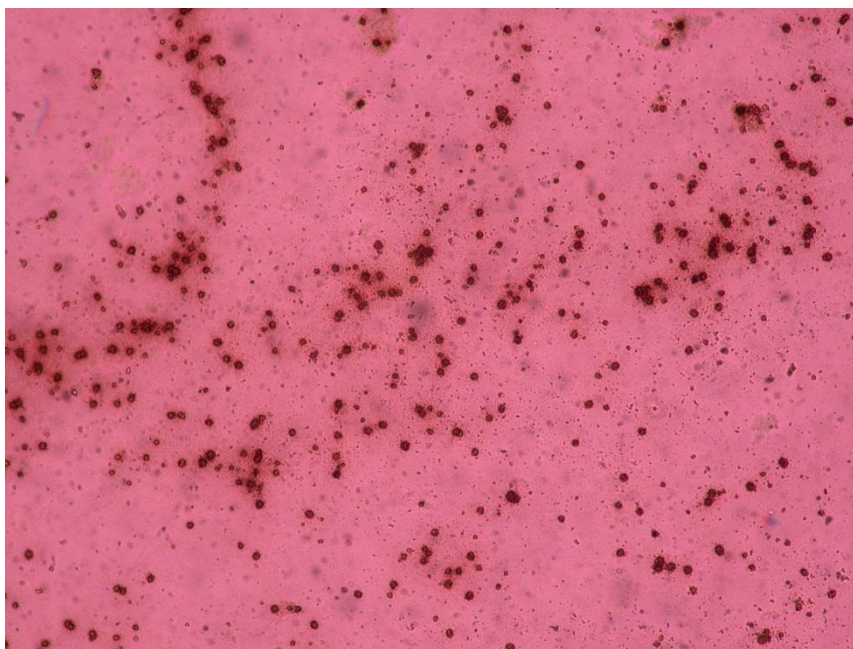
7 g Difco™ PPLO agaru a 0,03 g $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ se rozpustí ve 140 ml redestilované vody a pH média se upraví 10% roztoky NaOH nebo HCl na hodnotu 5,8-6,2. Poté se médium sterilizuje 15 minut při teplotě 121°C. Po vychladnutí na teplotu přibližně 50 – 60°C se přidají další složky:

40 ml koňského séra
20 ml kvasničného extraktu
800 µl linkomycínu (256 mg/l)
1 ml ampicilínu (200 mg/ml)
400 µl 40% urey
400 µl fenolové červeně
400 µl amfotericínu B (1 mg/ml).

Připravená agarová půda se rozlije do sterilních plastových Petriho misek o průměru 60 mm. Agarové půdy se uchovávají při teplotě 4°C nejdéle měsíc.

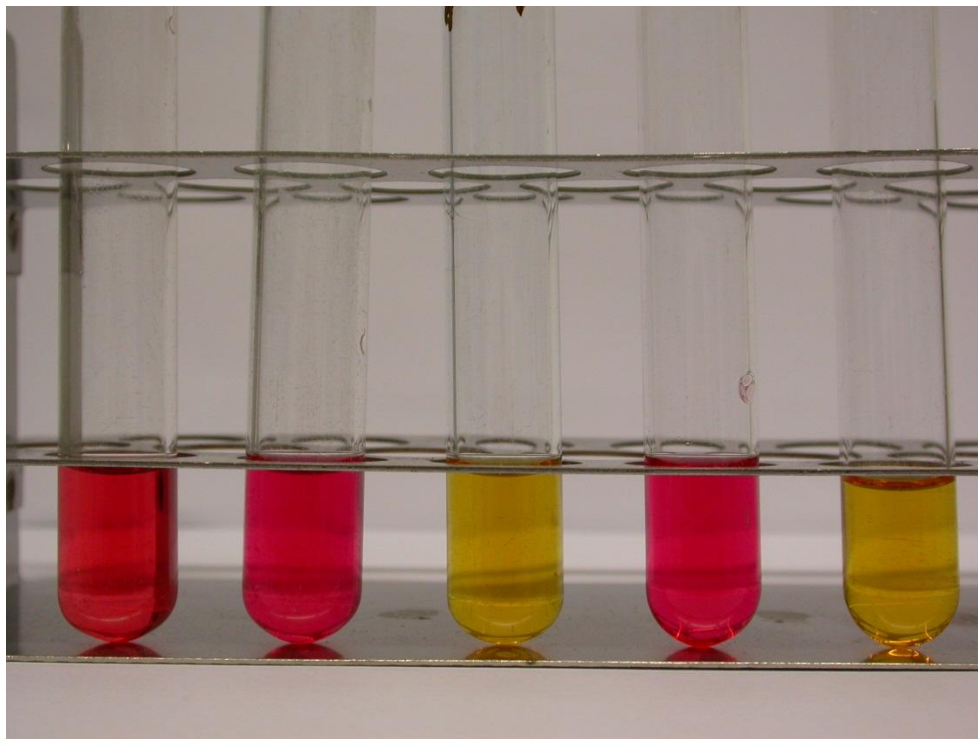
Ureaplasmata jsou fakultativně anaerobní bakterie. Rostou v atmosféře s 85-95 % N₂ a 5-15 % CO₂. PPLO bujóny lze inkubovat i v běžných atmosférických podmínkách. Inkubační teplota se pohybuje v rozmezí 36-38 °C a inkubační doba 48-96 hodin (Taylor-Robinson, 1993; Euzéby, 2012).

Nárůst ureaplasmat na PPLO agarech se hodnotí mikroskopicky při celkovém zvětšení ~ 100x. Kolonie ureaplasmat jsou výrazně menší (≤ 10-175 nm) než kolonie mykoplasmat (300-800 nm) a mají charakteristický nepravidelný tvar (viz obrázek 3). Drobné kolonie ureaplasmat jsou tmavě hnědé díky vyredukovanému burelu (Garrity, 2010; Euzéby, 2012).



Obrázek 3: Tmavé kolonie *Ureaplasma urealyticum* na PPLO agaru, 48 h, 37 °C, 5 % CO₂, celkové zvětšení 125x. Autor: RNDr. Petra Mosio, PhD.

Nárůst ureaplastů v tekutých půdách je založen na jejich schopnosti hydrolyzovat močovinu. Vznikající amoniak pak zvyšuje pH kultivačního média, což se projeví změnou zbarvení fenolové červeně z oranžové na malinově červenou (Euzéby, 2012), jak dokumentuje obrázek 4.



Obrázek 4: PLO bujóny s nárůstem (červené) a bez nárůstu (okrové) *Ureaplasma urealyticum*, 24 h, 37 °C, 5 % CO₂. Autor: RNDr. Petra Mosio, PhD.

1.10.3 Komerční sestavy

Test Mycoplasma IST2® (BioMérieux)

Test je založen na kultivačním průkazu *Mycoplasma hominis* a *U. urealyticum* a stanovení citlivosti k 9 antibiotikům (doxycyklin, josamycin, ofloxacin, erytromycin, tetracyklin, ciprofloxacin, azitromycin, klaritromycin a pristinamycin). Tento test umožňuje identifikaci mykoplastů do 48 hodin na základě jejich biochemické aktivity (hydrolyza argininu nebo močoviny) a zároveň také informuje o přibližném množství bakteriálních buněk v testovaném vzorku. Podle Zdrodowske-Stefanow a kol. (2006) svědčí počet buněk vyšší než 10^4 pro probíhající infekci.

Mycoplasma Duo (Bio-Rad)

Jedná se o kompletní set určený k průkazu *U. urealyticum* a *Mycoplasma hominis* ve vyšetřovaném materiálu (viz obrázek 5). Inkubace probíhá 24-48 hodin při 37 °C. Identifikace je opět založena na specifických metabolických vlastnostech jednotlivých druhů indikovaných změnou barvy fenolové červeně. Test obsahuje také jamku umožňující naředění inokula pro testování citlivosti na antibiotika, které však není součástí tohoto setu. Firma Bio-Rad dodává pro testování citlivosti samostatný test S.I.R. Mycoplasma (Bio-Rad, 2007).



Obrázek 5: Kit Mycoplasma Duo (Bio-Rad, 2007).

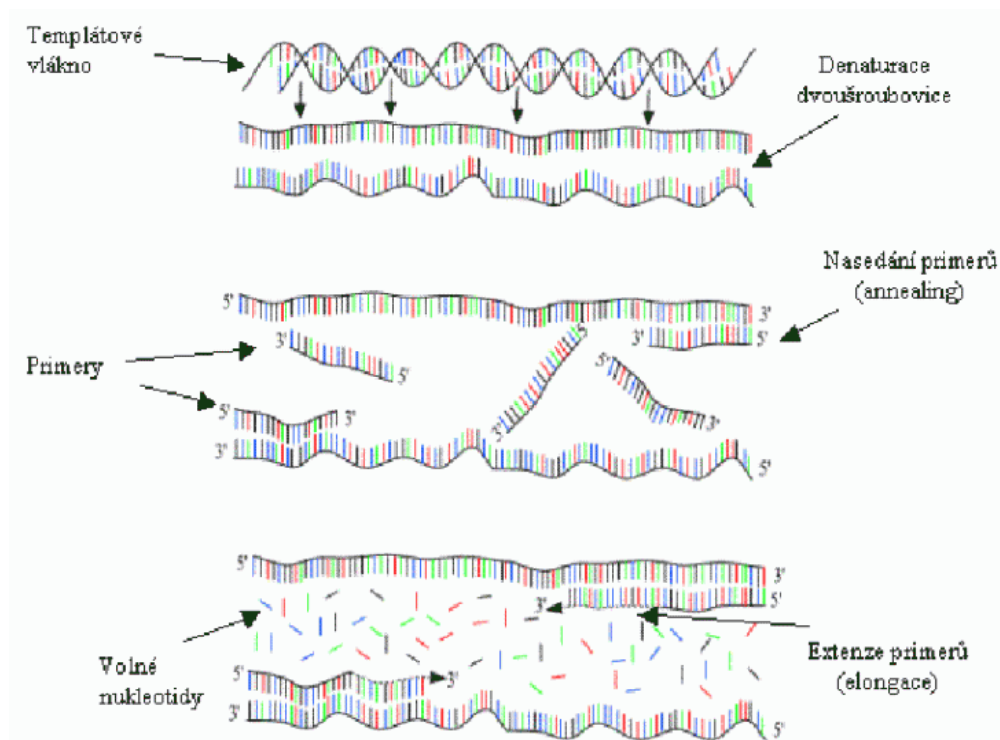
1.10.4 Molekulárně biologické metody

Mezi nejvíce používané molekulárně biologické metody k průkazu ureaplasmat patří polymerázová řetězová reakce (PCR, z angl. polymerase chain reaction) a její různé modifikace. Tyto metody se jeví jako citlivější a specifitější než běžná kultivace, jejich nevýhodou je však skutečnost, že prokazuje přítomnost mrtvých i živých buněk.

PCR

Jedná se o metodu navrženou v roce 1983 Karym Mullisem, který za svůj objev získal v roce 1993 Nobelovu cenu (Bartlett a Stirling, 2003).

Metoda je založena na mnohonásobném zmožení vzorového úseku DNA přítomném ve vzorku. Celá reakce se skládá z 3 kroků, které se cyklicky opakují. Prvním krokem je denaturace, při které dochází k zahřátí DNA na teplotu 94-98 °C. To má za následek rozvolnění dvoušroubovice DNA a vznik jednovláknité DNA, která slouží jako vzor pro syntetické oligonukleotidy (primery). Následuje tzv. annealing, který probíhá při 50-72 °C. V této fázi dochází k nasednutí primerů na komplementární úseky jednořetězců vzorové DNA. V poslední fázi – tzv. extenzi – jsou působením DNA polymerasy syntetizována nová vlákna DNA, a to tak, že dochází k prodloužení 3' konce nasedlého primeru. Na závěr posledního kroku se v reakční směsi nacházejí dva dvouřetězce vzorové DNA. PCR probíhá obvykle ve 20-35 opakovaných cyklech, při kterých dochází k exponenciálnímu nárůstu počtu kopií cílové DNA. Detekce amplifikovaného úseku DNA se provádí na agarózovém gelu s přidavkem ethidium bromidu. Výsledný elektroforeogram se prohlíží na UV transiluminátoru při vlnové délce 300 nm. (Sambrook a Russel, 2001). Průběh PCR je schematicky znázorněn na obrázku 6.



Obrázek 6: Průběh jednotlivých fází PCR (Zorníková, 2012).

Pro studium fylogenetické příbuznosti se jeví jako nejvhodnější gen 16S rRNA, což potvrdila řada studií (Fanronga kol., 2000; Robertson a kol., 2001; Sung a kol., 2006). Tento gen se skládá jak z vysoce konzervativních úseků, tak z úseků středně a vysoce variabilních, které umožňují rozlišení laboratorních i divokých kmenů ureaplasmat na úrovni druhů i biovarů (Robertson a kol., 2001).

PCR se stanovením hybridizací na mikrotitrační destičce

Jedná se o modifikaci PCR metody zakončenou stanovením produktů na mikrotitrační destičce. Reakce využívá biotinylované primery cílené u ureaplasmat do 520-bp oblasti genu 16S rRNA. Produkty PCR jsou po předchozí denaturaci varem a zchlazení rozpipetovány do jamek mikrotitrační destičky, na kterých jsou imobilizovány druhově specifické sondy. Následuje fáze hybridizace DNA sond s denaturovanými PCR produkty. Po důkladném promytí je přidána streptavidinperoxidasa, která vytvoří konjugát s biotinylovanými primery. Nakonec se přidá substrát streptavidinperoxidasy, např. BM Blue POD Substrát (fy Roche Diagnostics), který po zastavení enzymové reakce změní barvu (Yoshida a kol., 2003).

Multiplex PCR

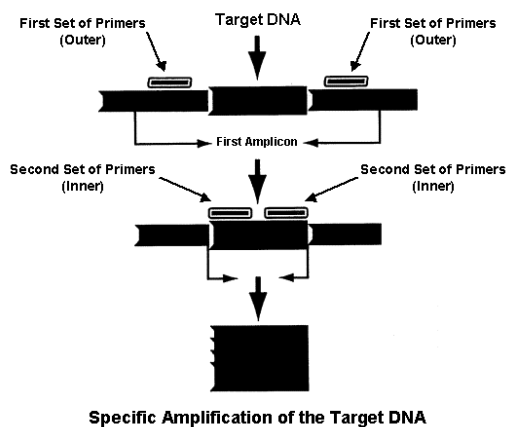
Multiplex PCR umožňuje současnou identifikaci více druhů mikroorganismů v jednom vyšetřovaném vzorku. Používá se více párů primerů, z nichž každý musí být cílený do vysoce konzervativních úseků DNA hledaného mikroorganismu. Další výhodou této metody je možnost propojení s real-time PCR (Tang a kol., 2011).

Pro identifikaci ureaplasmat v klinickém materiálu lze kromě in-house metod využít také některý z komerčně dostupných kitů, jako je např. Seeplex® STD6 ACE Kit. Tato detekční souprava umožňuje stanovení 6 nejčastějších sexuálně přenosných mikroorganismů - *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *U. urealyticum*, *M. hominis* a *Trichomonas vaginalis* (Lee a kol., 2012).

Nested PCR

Nested PCR je další modifikací PCR, rozdíl však spočívá v tom, že využívá dva páry primerů (viz obrázek 7). První pár primerů, tzv. vnější primery, mají stejnou funkci jako ve standardní PCR. Po 20-35 cyklech namnoží delší sekvenci

DNA, která pak slouží jako templát pro druhou dvojici, tzv. vnitřních primerů. Ty umožní namnožení kratší vnitřní sekvence. Detekce produktů se provádí opět gelovou elektroforézou. K výhodám této reakce patří vysoká výtěžnost a specifita. Metoda také umožňuje naředění inhibitorů PCR do velmi nízkých koncentrací (Lam a kol., 2007).



Obrázek 7: Schématické znázornění průběhu nested-PCR (Knox a Carrigan, 2005).

Real-time PCR

Metoda real-time PCR je založena na sledování průběhu PCR přímo během reakce tzv. v reálném čase. Speciální přístroj umožňuje nepřetržitě monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu, naproti tomu klasická PCR detekuje až finální produkt.

Specifické nebo nespecifické sondy se váží na syntetizovanou DNA a fluorescence měřená ve speciálních termocyklerech kontinuálně nebo na konci každého cyklu pak odráží množství nasyntetizovaných produktů.

Mezi nespecifické sondy patří interkalační barviva, např. SYBR® Green I, která mají schopnost vmezeřit se mezi vlákna vznikající DNA. Specifické sondy jsou krátké oligonukleotidy značené vhodným fluorescenčním barvivem. Z nejznámějších lze uvést např. TaqMan sondy.

Výhodou této metody je možnost kvantifikace syntetizovaného produktu. Dále také vysoká specifita (zejména při použití specifických sond) a citlivost. (Bustin a kol., 2009).

1.10.5 Sérologická typizace

Růstově inhibiční test

Principem testu je inhibice růstu daného kmene ureaplasmat na PPLO agaru specifickým antisérem, kterým je napuštěný disk filtračního papíru. Zóna inhibice růstu se odečítá mikroskopicky po 2-3 denní inkubaci při 37 °C v atmosféře 5 % CO₂.

Test je citlivý, nicméně jeho spolehlivost je dána použitím hyperimunních sér s vysokým titrem protilátek (Lin a Kass, 1974).

Imunofluorescenční test

Tato metoda je založena na označení kolonií ureaplasmat narostlých na PPLO agarech specifickými protilátkami s navázaným fluorochromem. Takto označené kolonie se pozorují ve fluorescenčním mikroskopu.

Jedná se o citlivou a specifickou metodu, která však vyžaduje kvalitní antiséra s vysokým titrem protilátek (Del Giudice a kol., 1967).

Test enzymové imunoanalýzy (ELISA, z angl. Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Antigen ureaplasmat reaguje se specifickou protilátkou, která je navázaná na povrchu pevné fáze, za tvorby imunokomplexu. Po promytí je přidána enzymaticky značená protilátka, která se naváže na antigen v imunokomplexu. Následuje přidání substrátu a chromogenu. Enzym vázaný na protilátce štěpí substrát a uvolňovaný produkt reaguje s chromogenem za vzniku barevné změny, která je detekována fotometricky. Jedná se o přesnou a citlivou metodu (Brown a kol., 1987; Echahidi a kol., 2001).

1.10.6 Testování citlivosti na antibiotika

Metody testování citlivosti na antibiotika lze rozdělit do dvou skupin – kvalitativní a kvantitativní. Do první skupiny patří disková difuzní metoda, která umožňuje označit mikroorganismus jako citlivý či rezistentní. Kvantitativní metody podávají informaci o stupni citlivosti mikroorganismu a umožňují určení tzv. minimální inhibiční koncentrace. MIC je definována jako nejnižší koncentrace antibiotika, která inhibuje viditelný růst mikroorganismu a je obvykle vyjadřována

v mg/l. Mezi kvantitativní metody řadíme agarovou a zkumavkovou diluční metodu, mikrodiluční metodu a E-test (Urbášková, 1998). Pro testování citlivosti ureaplasmat na antibiotika se využívají diluční metody.

Výsledné hodnocení citlivosti na antibiotika se provádí podle údajů doporučených Clinical Laboratory Standard Institute (2011) pro mykoplasmata humánního původu.

Agarová diluční metoda

MIC se odečítá na agarových půdách, které obsahují vybrané koncentrace antibiotik, vytvořené dvojkovým ředěním. Na připravené půdy se očkuje standardní inokulum *U. urealyticum* a vše se inkubuje při 37 °C v prostředí 5 % CO₂. MIC odpovídá agaru s nejnižší koncentrací antibiotika, na kterém je inhibován viditelný růst.

Jedná se o metodu referenční, která slouží k hodnocení přesnosti ostatních metod používaných pro testování citlivosti. Nevýhodou je její pracnost a časová i cenová náročnost (Urbášková, 1998).

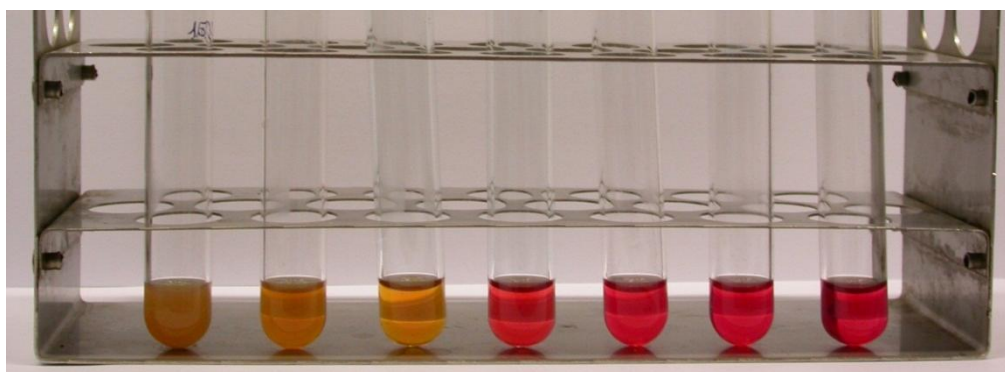
Agarovou diluční metodu použili Kenny a Cartwright (2001) a Cakan a kol. (2003), pro zjištění citlivosti izolovaných kmenů *U. urealyticum* na vybraná antibiotika.

Zkumavková diluční metoda

Tato metoda se provádí v 8-12 zkumavkách s PPLO bujónem obsahující kromě močoviny a fenolové červeně také vybrané koncentrace antibiotik, vytvořené dvojkovým ředěním. Do takto připravené řady se očkuje standardní inokulum *U. urealyticum* a vše se inkubuje při 37 °C v prostředí 5 % CO₂. MIC se odečítá v okamžiku, kdy je zaznamenán nárůst pozitivní kontroly (kmen *U. urealyticum* v PPLO bujónu bez přidaného antibiotika). Hodnota MIC odpovídá nejnižší koncentraci antibiotika, které zabrání růstu *U. urealyticum* (PPLO bujón nezmění barvu), jak dokumentuje obrázek 8.

Jedná se o vysoce standardizovanou metodu, používanou především pro výzkumné účely nebo při testování citlivosti určité bakterie pouze k jednomu antibiotiku. Je náročnější na přípravu, a proto se při rutinním testování v klinických laboratořích nepoužívá (Ferraro a Turnidge, 2003).

Aydin a kol. (2005) a Bébéar a kol. (2008) využili této metody k testování citlivosti *U. urealyticum* na vybraná antimikrobiální léčiva.



Obrázek 8: Zkumavková diluční metoda (*Ureaplasma urealyticum*, 37 °C, 48 h, 5 % CO₂). Autor: RNDr. Petra Mosio, PhD.

Mikrodiluční metoda

Tato metoda je založena na stejném principu jako zkumavková diluční metoda s tím rozdílem, že MIC se hodnotí v jamkách mikrotitrační destičky (viz obrázek 9). Metoda je poměrně jednoduchá a snadná na provedení a výsledky lze automaticky odečítat a vyhodnocovat. Nevýhodou je obtížné rozpoznání kontaminace, příp. rezistentních subpopulací (Urbášková, 1998).

Tuto metodu použili Beeton a kol. (2009) a Waites a kol. (2009) ke zjišťování citlivosti *U. urealyticum* na vybraná antibiotika.



Obrázek 9: Mikrodiluční metoda (*Ureaplasma urealyticum*, 37 °C, 48 h, 5 % CO₂). Autor: RNDr. Petra Mosio, PhD.

E-test

Je založen na difuzi koncentračního gradientu antibiotika z inertního plastického proužku do agarového média. Po proběhlé inkubaci v okolí proužku vznikne inhibiční zóna, která má tvar kapky. MIC se odečítá tam, kde hrot kapky protne plastický proužek. Jedná se o metodu jednoduchou, pro rutinní praxi je vhodným doplňkem diskové difuzní metody. Nevýhodou je vyšší cena v porovnání s ostatními metodami (Urbášková, 1998).

K testování citlivosti *U. urealyticum* na antibiotika využili E-test Dósa a kol. (1999) a Cakan a kol. (2003).

1.10.7 Nepřímá diagnostika

Průkaz specifických protilátek (IGM a IgG) proti ureaplasmatům lze provádět testem inhibice metabolismu, komplement-fixační reakcí, nepřímou imunofluorescencí nebo metodou ELISA.

Metabolismus inhibiční test

Metoda je založena na průkazu protilátek v patientském séru, které inhibují metabolismus ureaplasmat. Sérum je pro tento účel naředěno v PPLO bujónu a doplněno substrátem (močovinou), acidobazickým indikátorem (fenolovou červení) a příslušným kmenem ureaplasmat. Růst a metabolická aktivita se projeví změnou barvy PPLO bujónu z okrové na červenou. Titr metabolismus-inhibičních protilátek odpovídá nejvyššímu ředění séra, které ještě inhibuje množení ureaplasmat (Lin a Kass, 1974).

Nepřímá imunofluorescence

Protilátky z testovaného séra reagují s antigenem ureaplasmat navázaným na sklíčku. Po proběhlé inkubaci se na sklíčko nanese protilátka proti lidským imunoglobulinům značená fluorochromem (nejčastěji fluoresceinizothiokyanát). Výsledek je hodnocen ve fluorescenčním mikroskopu.

Nevýhodou testu je jednak možná chyba v důsledku subjektivního hodnocení preparátů. Dále pak může hrát roli také tzv. faktor nespecifické fluorescence, který může být způsoben například špatným promytím preparátu po přidání patientského séra (Furr a Taylor-Robinson, 1984; Bartůňková a kol., 2011).

Komplement fixační reakce (KFR)

Principem testu je navázání („fixace“) komplementu na vznikající komplex antigen-protilátka. Indikátorovým systémem jsou zde ovčí erythrocyty senzibilizované králičí protilátkou. Pokud je komplement vyvázan komplexem antigen-protilátka, erythrocyty zůstanou neporušené. V opačném případě se volný komplement naváže na senzibilizované erythrocyty a způsobí jejich lýzu. Výsledky se vyjadřují jako nejvyšší ředění séra, které ještě vykazuje aktivitu.

Metoda je velice oblíbená zvláště pro svou nízkou nákladovost, je však pracná a v porovnání s ostatními metodami méně citlivá. Výsledky mohou být ovlivněny antikomplementovou aktivitou vyšetřovaného séra (Jones a Sequeira, 1966; Bartůňková a kol., 2011).

ELISA

Metoda je založena na průkazu protilátek ve vyšetřovaném séru jejich vazbou na antigen imobilizovaný na povrchu jamky mikrotitrační destičky. Vzniklý komplex je prokázán enzymaticky značenými protilátkami po přidání příslušného substrátu a chromogenu. Následná barevná změna chromogenu, ke které dojde v důsledku enzymatického rozložení chromogenu, je prokazována fotometricky (Wiley a Quinn, 1984; Liepmann a kol., 1988; Lequin, 2005)

2 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo přiblížit problematiku kultivačně náročných bakterií *U. urealyticum* a *U. parvum*, se zaměřením na jejich patogenitu a metody přímého a nepřímého průkazu.

Ureaplasmata patří k nejmenším mikroorganismům schopným samostatného života na bezbuněčných kultivačních médiích. Název rodu je odvozen od jejich typické vlastnosti, a to produkce ureasy. V současnosti je do rodu *Ureaplasma* řazeno 7 druhů, z nichž jsou pro člověka nejvýznamnější druhy *U. urealyticum* a *U. parvum*.

Další zvláštností, kterou se ureaplasmata liší od ostatních bakterií, je úplná absence pevné buněčné stěny. Ta je v jejich případě nahrazena pružnou třívrstevnou membránou, složenou z bílkovin, fosfolipidů a cholesterolu. Chybění buněčné stěny je podkladem přirozené rezistence ureaplasmat k beta-laktamovým antibiotikům.

Vzhledem k malé velikosti genomu, jsou ureaplasmata dokonale adaptována na parazitický způsob života. Produkují řadu faktorů virulence, z nichž nejvýznamnější jsou tzv. MB antigeny. Vysoká variabilita těchto antigenů umožňuje ureaplasmatům unikat imunitnímu systému hostitele.

U. urealyticum a *U. parvum* se mohou vyskytovat na sliznicích urogenitálního traktu zdravých mužů a žen. I přes to, že jsou stále častěji spojovány s řadou akutních i chronických infekčních onemocnění, je jejich patogenní potenciál stále diskutován. Jejich výskyt u těhotných žen zvyšuje riziko komplikací, jako jsou předčasné porody, potraty, horečky po porodu nebo potratu a endometritidy. Ureaplasmata jsou nejčastěji izolovanými mikroorganismy z plodové vody a placenty žen, které předčasně porodily, a jsou pravděpodobně zodpovědné za spuštění mechanismu předčasného porodu. U předčasně narozených novorozenců mohou ureaplasmata vyvolávat závažné infekce respiračního traktu, meningitidy a sepse.

Léčba ureaplasmových infekcí není obtížná, nicméně počet kmenů rezistentních na běžně používaná antibiotika stále narůstá. Proto je důležité

zjišťovat citlivost jednotlivých izolovaných kmenů a na základě získaných informací antimikrobiální terapii upravit.

Ureaplasmata patří mezi kultivačně náročné mikroorganismy vyžadující ke svému růstu komplexní kultivační média s obsahem kvasničného extraktu a cholesterolu. V běžné praxi se používají komerčně dodávané sety, které ke kultivaci mykoplasmat využívají tekutá živná média. Kultivace na pevných půdách se provádí téměř výhradně ve výzkumných laboratořích. Další možností je průkaz ureaplasmat polymerázovou řetězovou reakcí nebo některou z jejich modifikací. Nepřímý průkaz se běžně neprovádí.

Za pomoci odborné literatury jsem se v bakalářské práci pokusila shrnout dostupné informace týkající se *U. urealyticum* a *U. parvum*. Teorii o přímém průkazu ureaplasmat jsem měla možnost podložit vlastní zkušeností s kultivací na tekutých i pevných půdách i provedením druhově-specifické polymerázové řetězové reakce. I přes nejednoznačné stanovisko odborné veřejnosti k patogennímu potenciálu ureaplasmat, by se neměl jejich význam podceňovat.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

BARTLETT, J. M.; STIRLING, D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *Methods in Molecular Biology*, 2003, roč. 226, č. 3-6. ISBN 1064-3745.

BARTŮŇKOVÁ, J. a kol. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2 vyd. Praha: Grada Publishing, 2011. 168 s. ISBN 978-80-247-3533-7.

BÉBÉAR, C. M. a kol. Comparative activities of telithromycin (HMR 3647), levofloxacin, and other antimicrobial agents against human mycoplasmas. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, roč. 44, č. 7, s. 1980–1982. ISSN 1098-6596.

BÉBÉAR, C. M. a kol. Activity of moxifloxacin against the urogenital mycoplasmas *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2008, roč. 14, č. 8, s. 797-812. ISSN 1469-0691.

BEETON, M. L. a kol. Concurrent Titration and Determination of Antibiotic Resistance in *Ureaplasma* Species with Identification of Novel Point Mutations in Genes Associated with Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, roč. 53, č. 5, s. 2020-2027. ISSN 0066-4804.

BIO-RAD. *Mycoplasma Duo. Kit for the Identification and Differential Titration of Genital Mycoplasmas*, 2007.

BROWN, M. B. a kol. Measurement of antibody to *Mycoplasma hominis* by an enzyme-linked immunoassay and detection of class-specific antibody responses in women with postpartum fever. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1987, roč. 156, č. 3, s. 701-708. ISSN 0002-9378.

BUSTIN, S. A. a kol. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 2009, roč. 55, č. 4, s. 611-622. ISSN 0009-9147.

CAKAN, H. a kol. Assessment of Antibiotic Susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* from Prostitutes and Outpatient Clinic Patients Using the E-Test and Agar Dilution Method. *Chemotherapy*, 2003, roč. 49, č. 1-2, s. 39-43. ISSN 0009-3157.

CLSI document M43-A. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas, Approved Guideline*. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011. 35 s. ISBN 1-56238-769-3.

CULTRERA, R. a kol. Molecular evidence of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* colonization in preterm infants during respiratory distress syndrome. *BMC Infectious Diseases*, 2006, č. 6, s. 166. ISSN 1471-2334.

DEL GIUDICE, R. A. ROBILLARD, R. F. a CARSKI, T. R. Immunofluorescence Identification of *Mycoplasma* Agar by Use of Incident Illumination. *Journal of Bacteriology*, 1967, roč. 93, č. 4. s. 1205-1209. ISSN 0021-9193.

DÓSA, E. a kol. Evaluation of the Etest for the susceptibility testing of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1999, roč. 43, č. 4, s. 575-578. ISSN 0305-7453.

DOUBEK, R., PETROVOVÁ, D. *Ureaplasma urealyticum* jako původce chronického vaginálního fluoru: retrospektivní studie. *Praktická Gynekologie*, 2006, roč. 10, č. 3, s. 108-110. ISSN 1211-6645.

ECHAHIDI, F. a kol. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serotyping *Ureaplasma urealyticum* Strains Using Monoclonal Antibodies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2001, roč. 8, č. 1, s. 52-57. ISSN 1071-412X.

EUZÉBY, J. P. Rod *Ureaplasma* [online]. [vid.2012-06-04]. Dostupné z www: <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/uu/ureaplasma.html>.

FERRARO, M. J. a TURNIDGE, J. D. Antimicrobial agents and susceptibility test methods, Section V. In: *Manual of Clinical Microbiology*. 8. vyd. Washington : American Society for Microbiology Press, 2003. 2322 s. ISBN 1555812554.

FURR, P. M. a TAYLOR-ROBINSON, D. Microimmunofluorescence technique for detection of antibody to *Mycoplasma genitalium*. *Journal of Clinical Pathology*, 1984, roč. 37, č. 9, s. 1072-1074. ISSN 0021-9746.

GARRITY, G. M. a kol. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 4*. 2. vyd. New York : Springer, 2010. 931 s. ISBN 978-0-387-95042-6.

GLASS, J. I. a kol. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature*, 2000, roč. 407, č. 6805, s. 757-762. ISSN 0028-0836.

GREENWOD, D. a kol. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 1999. 686 s. ISBN 80-7169-365-0.

GUMP, D. W; GIBSON, M.; ASHIKAGA, T. Lack of association between genital mycoplasmas and infertility. *The New England Journal of Medicine*, 1984, roč. 310, s. 937–41. ISSN 0028-4793.

IMUDIA, A. N. a kol. The prevalence of *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections, and the Rubella status of patients undergoing an initial infertility evaluation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2008, roč. 25, č. 1, s. 43–46. ISSN 1573-7330.

JONES, D. M. a SEQUEIRA, P. J. The distribution of complement-fixing antibody and growth-inhibiting antibody to *Mycoplasma hominis*. *The Journal of Hygiene*, 1966, roč. 64, č. 4, s. 441-449. ISSN 0022-1724.

KACEROVSKY, M., PAVLOVSKY, M. a TOSNER, J. Preterm premature rupture of the membranes and genital mycoplasmas. *ACTA MEDICA (Hradec Králové)*, 2009, roč. 53, č.3, s. 117–120. ISSN 1211-4286.

KILIC, D. a kol. Prevalence and treatment of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Mycoplasma hominis* in patients with non-gonococcal urethritis. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2004, roč. 57, č. 1, s. 17-20. ISSN 1344-6304.

KNOX, K. K. a CARRIGAN D. R. *Detection of HHV-6, EBV and HTLV-2 Genomic DNAs by Nested PCR* [online]. Milwaukee, USA: Institute for Viral Pathogenesis, aktualizováno 2001-2005 [vid. 2012-06-19]. Dostupné z [www: http://www.ivpresearch.org/images/Nested%20PCR%20Figure%20Power%20Point.gif](http://www.ivpresearch.org/images/Nested%20PCR%20Figure%20Power%20Point.gif).

KATZ, B. a kol. Characterization of ureaplasmas isolated from preterm infants with and without bronchopulmonary dysplasia. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, roč. 43, č. 9, s. 4852–4854. ISSN 0095-1137.

KENNY, G. E. a CARTWRIGHT, F. D. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *M.pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to new glycolcyclines in comparison with those to older tetracyclines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1994, roč. 38, č. 11, s. 2628–2632. ISSN 1098-6596.

KENNY, G. E. a CARTWRIGHT, F. D. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *M.pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to GAR-936, dalfofpristin, dirithromycin, evernimicin, gatifloxacin, linezolid, oxifloxacin, quinupristin-dalfofpristin, and telithromycin compared to their susceptibilities to reference macrolides, tetracyclines, and quinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, roč. 45, č. 9, s. 2604–2608. ISSN 1098-6596.

KRAUSSE, R.; SCHUBERT, S. In-Vitro Activities of Tetracyclines, Macrolides, Fluoroquinolones and Clindamycin against *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* ssp. isolated in Germany over 20 years. *Clinical Microbiology and Infection*, 2010, roč. 16, č. 11, s. 1649–1655. ISSN 1469-0691.

KONG, F. a kol. Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum* – support for the establishment of a new species, *Ureaplasma parvum*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, roč. 49, s. 1879-1889. ISSN 0020-7713.

KONG, F. a kol. Species Identification and Subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* Using PCR-Based Assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, roč. 38, č. 3, s. 1175-1179. ISSN 0095-1137.

LAM, W. Y. a kol. Rapid Multiplex Nested PCR for Detection of Respiratory Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, roč. 45, č. 11, s. 3631–3640. ISSN 0095-1137.

LARSEN, B. a HWANG, J. *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and adverse pregnancy outcomes: A fresh look. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, Hindawi Publishing Corporation, 2010. ISSN 1098-0997.

LEE, S-J. a kol. Evaluation of Seeplex®STD6 ACE Detection kit for the diagnosis of six bacterial sexually transmitted infections. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2012. ISSN 1437-7780. Dostupné též na [www: http://www.springerlink.com/content/d7246228676971u6/](http://www.springerlink.com/content/d7246228676971u6/).

LEQUIN, R. M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 2005, roč. 51, č. 12, s. 2415-2418. ISSN 0009-9147.

LIEPMANN, M. F. a kol. Detection of Antibodies to *Ureaplasma urealyticum* in Pregnant Women by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Membrane Antigen and Investigation of the Significance of the Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, roč. 26, č. 10, s. 2157-2160. ISSN 0095-1137.

LIN, J. S. a KASS, E. H. Serological Reactions of *Mycoplasma hominis*: Differences Among Mycoplasmacidal, Metabolic Inhibition, and Growth Agglutination Tests. *Infection and Immunity*, 1974, roč. 10, č. 3, s. 535-540. ISSN 0019-9567.

MINION, F. C. a JARVILL-TAYLOR, K. Membrane-associated hemolysin activities in mycoplasmas. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, roč. 116, č. 1, s. 101-106. ISSN 1574-6968.

NAGATA, Y.; IWASAKA, T.; WADA, T. Mycoplasma infection and infertility. *Fertility and Sterility*, 1979, roč. 31, s. 392-395. ISSN 0015-0282.

PEREYRE, S. a kol. Characterisation of in vitro-selected mutants of *Ureaplasma parvum* resistant to macrolides and related antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2007, roč. 29, č. 2, s. 207-211. ISSN 0924-8579.

PITCHER, D.; SILLIS, M. a ROBERTSON, J. A. Simple Method for Determining Biovar and Serovar Types of *Ureaplasma urealyticum* Clinical Isolates Using PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001; roč. 39, č. 5, s. 1840-1844. ISSN 0095-1137.

PLETTENBERG, A.; MEIGEL, W. a SCHÖFER, H. *Infektionskrankheiten der Haut*. 3. vyd. Stuttgart : Thieme, 2010. 455 s. ISBN 978-3-13-137733-3.

RAMPERSAUD, R., RANDIS, T. M. a RATNER, A. J. Microbiota of the upper and lower genital tract. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 2012, roč. 17, č. 1, s. 51-57. ISSN 1744-165X.

RAZIN, S. a kol. Morphology of *Ureaplasma urealyticum* Organsims and colonies. *Journal of Bacteriology*, 1977, roč. 130, č. 1, s. 464-471. ISSN 0021-9193.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, roč. 62, č. 4, s. 1094-1156. ISSN 1092-2172.

RAZIN, S. a HERRMANN, R. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. New York : Kluwer Academic/Plenar Publishing. 2002. 573 s. ISBN 0-306-47287-2.

ROBERTSON, J. A. a kol. Proposal of *Ureaplasma parvum* sp. nov. and emended description of *Ureaplasma urealyticum* (Shepard et al. 1974) Robertson et al. 2001. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, roč. 52, s. 587-597. ISSN 1466-5034.

Rodriguez, R. a kol. Genital infection and infertility. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2001, roč. 19, s. 261–266. ISSN 0213-005X.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3. vyd. Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. 2344 s. ISBN 0-87969-576-5.

SAMRA, Z.; ROSENBERG, S. a DAN, M. Susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* to tetracycline, doxycycline, erythromycin, roxithromycin, clarithromycin, azithromycin, levofloxacin and moxifloxacin. *Journal of Chemotherapy*, 2011, roč. 23, č. 2, s. 77–79. ISSN 1973-9478.

SCHMIDT, J. W. *Diagram of binary fission*[online]. 2006 [vid. 2012-06-20]. Dostupné z: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/00/Binary_fission.png.

SHEPARD, M.C. a kol. *Ureaplasma urealyticum* gen. nov., sp. nov.: Proposed Nomenclature for the Human T (T-strain) Mycoplasmas. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1974, roč. 24, č. 2, s. 160-171.

SUNG, H. a kol. PCR-Based Detection of Mycoplasma Species. *The Journal of Microbiology*, 2006, roč. 44, číslo 1, s. 42 – 49. ISSN 1225-8873.

TANG, J. a kol. Novel multiplex real-time PCR system using the SNP technology for the simultaneous diagnosis of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* and genetic typing of serovars of *C. trachomatis* and *U. parvum* in NGU. *Molecular and Cellular Probes*, 2011, č. 25, s. 55 – 59. ISSN 0890-8508.

TAYLOR-ROBINSON, D.; McCORMACK, W. M. The genital mycoplasmas (first of two parts). *The New England Journal of Medicine*, 1980, roč. 302, č. 18, s. 1003-1010. ISSN 0028-4793.

TAYLOR-ROBINSON, D. The *Mycoplasmatales*. In *Systematic Bacteriology*. Philadelphia, Pennsylvania: B. C. Decker Inc. 1993, s. 664-681. ISBN 1-55664-290-3.

TAYLOR-ROBINSON, D. Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: An Update. *Clinical Infectious Diseases*, 1996, roč. 23, s. 671-684. ISSN: 1058-4838.

URBÁŠKOVÁ, P. *Rezistence bakterií k antibiotikům-vybrané metody*. Praha : Trios, 1998. ISBN 80-238-3106-2.

VISCARDI, R. M. a kol. Incidence of invasive ureaplasma in VLBW infants: relationship to severe intraventricular hemorrhage. *Journal of Perinatology*, 2008, roč. 28, č. 11, s. 759–765. ISSN 0743-8346.

VISCARDI, R. M., HASDAY, J. D. Role of *Ureaplasma* species in neonatal chronic lung disease: epidemiologic and experimental evidence. *Pediatric Research*, 2009, roč. 65, č. 5, s. 84R–90R. ISSN 1530-0447.

WAITES, K. B. a kol. Congenital and opportunistic infections: *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis*. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 2009a, roč. 14, s. 190-199. ISSN 1744-165X.

WAITES, K. B., CRABB, D. M. a DUFFY, L. B. Comparative *in vitro* susceptibilities of human mycoplasmas and ureaplasmas to a new investigational ketolide, CEM-

101. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009b, roč. 53, č. 3, s. 2139–2141. ISSN 1098-6596.

WILEY, C. A. a QUINN, P. A. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Specific Antibodies to *Ureaplasma urealyticum* Serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 1984, roč. 19, č. 3, s. 421-426. ISSN 0095-1137.

YOSHIDA, T. a kol. Rapid Detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, and *Ureaplasma urealyticum* Organisms in Genitourinary Samples by PCR-Microtiter Plate Hybridization Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, roč. 41, číslo 5., s. 1850 – 1855. ISSN 0095-1137.

ZDRODOWSKA-STEFANOW, B. a kol. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infection in women with urogenital diseases. *Advances in Medical Sciences*, 2006, roč. 51, s. 250-253. ISSN 1896-1126.

ZEIGHAMI, H., PEERAYEH, S. N., YAZDI, R. S., SOROURI, R. Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in semen of infertile and healthy men. *International Journal of STD & AIDS*, 2009, roč. 20, č. 6, s. 387–390. ISSN 1758-1052.

ZHU, C. a kol. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in Chinese women with genital infectious diseases. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 2012, roč. 78, č. 3, s. 406-407. ISSN 0378-6323.

ZORNÍKOVÁ, G. Využití polymerázové řetězové reakce (PCR) pro detekci probiotických mikroorganismů [online]. Brno: Mendelova univerzita v Brně, aktualizováno 2012 [vid. 2012-06-19]. Dostupné z www: <http://www.chempoint.cz/data/imgs/01065l.gif>.