



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta zdravotně sociální
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Mikrobiologická diagnostika urogenitálních mykoplasmát

Vypracovala: Dominika Oudesová
Vedoucí práce: MUDr. Šárka Lásiková

České Budějovice 2015

Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na diagnostiku urogenitálních mykoplasm a to sice *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* a *Ureaplasma urealyticum*. Tyto bakterie jsou nejmenšími volně žijícími organismy, které jsou schopné replikace na umělých bezbuněčných půdách. U člověka se přenášejí se především nechráněným pohlavním stykem. Mohou být příčinou mnoha urogenitálních infekcí jako např. negonokoková uretritida, bakteriální vaginóza, pyelonefritida. Mykoplasmata také mohou mít za následek předčasný odtok plodové vody, předčasný porod, smrt plodu či poporodní horečku.

Práce v první řadě informuje o současném stavu, základní morfologii, výskytu bakterií a jejich množení. Dále je v práci věnován prostor urogenitálním infekcím, které se objevují u mužů či žen nebo se mohou přenášet z matky na plod. Zhodnocení současného stavu je ukončeno metodami průkazu těchto bakterií, jako je přímý a nepřímý průkaz. Podrobněji je rozebrán průkaz pomocí diagnostických setů, pomocí kterých byly vyšetřeny vzorky v praktické části mé bakalářské práce.

Praktická část mé bakalářské práce byla prováděna na oddělení klinické mikrobiologie v Nemocnici Na Bulovce. Pro mou práci byly poskytnuty vzorky z urogenitálního traktu.

Vzorky byly vyšetřeny v období od 1. 7. – 31. 12. 2014. Celkem bylo k dispozici 380 vzorků. 159 vzorků pro vyšetření na *Mycoplasma genitalium* a 221 vzorků na vyšetření *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*.

Ve všech třech případech bylo více pozitivní vzorků od žen, přestože u mužů bylo podstatně více vzorků k vyšetření než od žen. Patogen *Mycoplasma genitalium* byl prokázán u 11,4% žen a 7% mužů. Na *Ureaplasma urealyticum* bylo pozitivní 43,6% žen a 12,7% mužů a na *Mycoplasma hominis* 12,8% žen a 7,7% mužů.

Ve většině případů šlo o pacienty, u kterých se již projevovaly klinické potíže, pacienty, kteří nebyli správně vyšetřeni a léčeni nebo šlo o chronické infekce.

Abstract

This bachelor thesis focuses on the diagnostics of urogenital mycoplasmas, namely *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum*.

These bacteria are the smallest freely living organisms capable of replication on artificial cell-free media. They are transmitted especially by unprotected sexual intercourse. They can then cause variety of urogenital infections, for example urethritis, bacterial vaginosis, pyelonephritis. Mycoplasma can also cause early fetal outflow, early labor, fetal death or postpartum fever.

The thesis informs about the current state, basic morphology, bacteria occurrence, reproduction. It also deals with urogenital infections that occur in men, women or about potential transmission from mother on the fetus. The overview of the current state concluded with the description of - methods used for identification of these bacteria, e.g. direct or indirect detection. The methods used for examination of samples in the practical part of this thesis are discussed in detail.

The practical part was conducted in the Department of Clinical Microbiology of the Na Bulovce Hospital, Prague. The Department provided me with samples from the genitourinary tract.

The samples examined originated - from the time period July 2014 to December 2014. Altogether there were 380 samples available. 159 samples for examination of *Mycoplasma genitalium* and 221 samples for examination of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*.

Overall, - there were more positive samples from women, although there were more samples to examine from men than from women. In case of *Ureaplasma urealyticum* 43.6 % women were positive and 12.7 % men were positive, in case of *Mycoplasma hominis* 12.8% women and 7.7% men were positive.

In most cases these were patients that showed clinical problems, patients, who had not been - previously examined and treated properly or their condition was a chronic problem.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila své poděkování vedoucí práce MUDr. Šárce Lásikové za odborné vedení mé bakalářské práce, trpělivost a čas, který mi věnovala. Stejně tak bych ráda poděkovala celému oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice Na Bulovce za vstřícnost při provádění praktické části mé bakalářské práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala i své rodině za podporu po celou dobu mého studia.

Obsah

1.	Současný stav.....	10
1.1	Mykoplasmata.....	10
1.2	Taxonomie.....	11
1.2.1	Řád Mycoplasmatales	11
1.2.2	Řád Acholeplasmatales	12
1.3	Množení	13
1.3.1	Identifikace Mykoplasmat a Ureaplasmat.....	13
1.4	Morfologie.....	14
1.4.1	Antigenní vlastnosti	16
1.5	Infekce způsobující urogenitální mykoplasmata	16
1.5.1	Urogenitální infekce.....	16
1.5.2	Negonokoková uretritida (NGU).....	17
1.5.3	Močová infekce a litiáza	18
1.5.4	Onemocnění pohlavních orgánů u ženy a následky infekce	18
1.5.5	Onemocnění v těhotenství a infekce novorozenců	18
1.5.6	Zánět plodových blan.....	20
1.5.7	Infekce novorozenců.....	20
1.5.8	Infekce pacientů se sníženou imunitou.....	21
1.6	Diagnostika a léčba.....	21
1.7	Diagnostické metody	23
1.7.1	Nepřímý průkaz	23
1.7.2	Přímý průkaz.....	23
1.7.3	Přímá mikroskopie	23
1.7.4	Kultivace	24
1.7.5	Identifikace mykoplasmat a ureaplasmat	25
1.7.6	MycoView®.....	25
1.7.6.1	Princip stanovení.....	26
1.7.7	Diagenode <i>Mycoplasma genitalium</i> Real Time PCR kit.....	27
1.7.8	PCR.....	27

1.7.8.1	Princip metody.....	28
1.7.9	Kvantitativní PCR v reálném čase.....	28
1.7.9.1	Princip metody.....	29
2.	Cíl práce.....	30
3.	Metodika.....	31
3.1	Charakteristika souboru.....	31
3.2	Detekce <i>Mycoplasma genitalium</i>	32
3.2.1	Izolace DNA.....	32
3.2.2	Postup izolace.....	33
3.2.3	Vlastní izolace v přístroji.....	34
3.2.4	Příprava vzorku pomocí QIAcube.....	34
3.2.5	Příprava pro PCR reakci.....	35
3.2.6	PCR analýza a odečet.....	36
3.3	Detekce <i>Ureaplasma urealyticum</i> a <i>Mycoplasma hominis</i>	37
3.3.1	Postup práce.....	38
3.3.2	Výsledky a interpretace.....	40
3.3.3	Identifikace a diferenciální titrace vzorku urogenitálních mykoplasm.....	40
4.	Výsledky.....	41
5.	Diskuse.....	47
6.	Závěr.....	50
7.	Klíčová slova.....	51
8.	Citace.....	52
9.	Přílohy.....	56

Seznam použitých zkratek

CCU – Color Changing Unit

DNA – Deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

LCR – Ligase Chain Reaction

M. – Mycoplasma

M.h. – Mycoplasma hominis

M.g. Mycoplasma genitalium

NCU – Chlamydia trachomatis

NGU – Neagonokoková uretritida

PCR - Polymerase Chain Reaction

PID - Pelvic inflammatory disease

PPLO – Pleuropneumonia Like Organism

PPROM - Preterm premature rupture of the membranes

STD - Sexually Transmitted Diseases

U. - Ureaplasma

U. u. - Ureaplasma urealyticum

WHO – World Health Organization

Úvod

Mykoplasmata jsou gramnegativní bakterie bez zevní buněčné stěny, která patří mezi nejmenší a nejjednodušší bakterie. V pohlavním ústrojí člověka se nejčastěji nacházejí tři druhy, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* a *Mycoplasma genitalium*. Zatímco u mužů tyto bakterie způsobují primárně uretritidu, tak u žen jsou příčinou vaginitidy, komplikací v těhotenství a mnoha další onemocnění.

Mykoplasmatické infekce v urogenitálním traktu se vyskytují přibližně u 40% sexuálně aktivní populace. Příčinou takto vysokého procentního zastoupení v populaci může být nedostatečná informovanost jedinců, i vyšší počet sexuálních partnerů. Další příčinou by mohlo být vysoké procento žen, které užívají hormonální antikoncepci a při pohlavním styku se již nechrání žádnou bariérovou ochranou jako je třeba prezervativ a tak může docházet k rychlému přenosu těchto bakterií. Webových stránek věnujících se mykoplasmatické infekci není mnoho a informace na těchto stránkách jsou mnohdy nedostatečné a zkreslené. Odborná literatura je pak pro laickou veřejnost těžce dostupná. V neposlední řadě může být příčinou hojného výskytu mykoplasmatické infekce i snižující se věk sexuálně aktivní populace.

V běžné praxi se na mykoplasmové bakterie dělají testy až po vyloučení všech ostatních urogenitálních infekcí, což může být velký problém zvláště u pacientů, kteří trpí již chronickou infekcí, které se velmi těžce léčí. Důvodem je finanční náročnost diagnostických setů i nedostatečná informovanost pacientů. Diagnostika mykoplasmat prochází v poslední době velkým vývojem a zavádí se nové techniky, které nejsou ještě tak známé a neprovádí se na každém pracovišti, i z tohoto důvodu jsem si problematiku mykoplasmat zvolila jako téma své bakalářské práce.

1. Současný stav

1.1 Mykoplasmata

Počet pacientů s kožními a slizničními projevy na genitálu v ambulancích dermatovenerologů roste a to jak z důvodu snižující se věkové hranice začátku sexuální aktivity (před 16. rokem věku), tak z obav před hrozbou nákazy HIV, ale i možností vzniku premaligních či maligních lézí souvisejících se sexuálně přenosnými infekcemi.⁽⁹⁾

Mykoplasmata jsou nejmenší prokaryotní organismy, jež rostou na umělých půdách. Lze je izolovat z člověka, zvířat, rostlin, hmyzu a z půdy. První mikrob této skupiny, *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides*, byl izolován před koncem 19. století z dobytčat nakažených pleuropneumonií.⁽¹⁰⁾

Po objevu původce bovinní pleuropneumonie byly tyto mikroorganismy nalezeny i u ovcí, koz, hlodavců, psů a drůbeže. Průlomovým v názorech o hostitelském vztahu mykoplasmat byl ve 40. letech 20. století jejich nález ve spodní části genitálního traktu žen.⁽³⁰⁾

Spolu s podobnými patogenními a saprofytickými mikroby izolovanými z člověka a zvířat byli původně označováni jako *PPLO* (Pleuropneumonia Like Organism), nyní se nazývají *mykoplasmata*. Jméno mykoplasma je odvozeno od větvení (podobně jako u hub), pleomorfismu, jež je pro některé druhy těchto mikrobů charakteristický.⁽¹⁰⁾ Pro člověka mají význam rody *Mycoplasma* a *Ureaplasma*.⁽⁴⁾

Objevují se ale i další významné patogeny, jejichž průkaz je zatím v běžné klinické praxi málo dostupný. Příkladem je patogen *Mycoplasma genitalium*, u kterého již byla prokázána humánní patogenita.⁽²⁹⁾ *Mycoplasma genitalium* bylo poprvé izolováno v roce 1980, a to ve spojitosti s NGU (Negenokoková uretritida) u mužů.⁽⁵⁾ U žen naopak může *Mycoplasma genitalium* způsobovat zánětlivé onemocnění v pánevní oblasti, cervicitidu a endometritidu.⁽¹¹⁾

Mycoplasma hominis není schopno působit morfologické změny na epitelu vejcovodů. Tímto Baczynska vyvrátila diskutovaný vztah mezi *Mycoplasma hominis* a infertilitou. Naopak tato schopnost byla prokázána u *Mycoplasma genitalium*.⁽¹⁾

1.2 Taxonomie

Mykoplasmata tvoří fylogenetickou větev s nízkým zastoupením guaninu a cytosinu a jsou úzce spjata se dvěma druhy klostridií - *Clostridium innocuum* a *Clostridium ramosum*.⁽²⁷⁾

Názvem mykoplasmata se běžně označují bakterie bez rigidní buněčné stěny.⁽²³⁾ Mykoplasmata patří do zvláštní skupiny bakterií, zařazených do třídy *Mollicutes* (*mollis*- -měkký, *cutis* – kůže).⁽³⁾ *Mollicutes* se pravděpodobně vyvinuli delecí genů z grampozitivních bakterií.⁽²³⁾

Mollicutes mají v přírodě široké spektrum hostitelů. Zatímco pro rody *Mycoplasma*, *Ureaplasma* a *Anaeroplasma* jsou typickými hostiteli živočichové, rod *Acholeplasma* je možné zachytit ve vodě a půdě, další rod *Spiroplasma* je patogenní - pro rostliny a hmyz a rod *Thermoplasma* byl nalezen v extrémně horkém prostředí doutnajícího uhlí.⁽³⁾

1.2.1 Řád Mycoplasmatales

Mycoplasmatales vyžadují pro svůj zdárný růst přítomnost cholesterolu a většinou i zvýšenou tenzi CO₂ v atmosféře. Řád obsahuje čeleď *Mycoplasmataceae* s rody *Mycoplasma* a *Ureaplasma*.

Rod *Mycoplasma* sdružuje zhruba 100 druhů osidlujících rostliny, hmyz i vyšší živočichy včetně člověka.⁽²³⁾ U člověka se vyskytuje několik druhů na sliznici dýchacího a urogenitálního traktu.⁽³⁾ Z lidského klinického materiálu bylo vypěstováno šestnáct druhů. Z častěji nalézaných jsou to jmenovitě *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma salivarium* a *Mycoplasma pneumoniae* v dutině ústní a v dýchacích cestách a druhy *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma genitalium* a *Mycoplasma penetrans* ve vzorcích z urogenitálního traktu mužů i žen.⁽²³⁾

Rod *Ureaplasma* je reprezentován šesti druhy. U člověka se nalézá pouze *Ureaplasma urealyticum*.

Jak již bylo řečeno, zástupci řádu *Mycoplasmatales* se od jiných bakterií odlišují absencí rigidní buněčné stěny.⁽²³⁾ Povrch buněk představuje třívrstevná cytoplasmatická membrána (1-8 nm), která obsahuje 2/3 bílkovin, 1/3 lipidů a asi 1% cukrů. Významnou složkou membrány je cholesterol, který přispívá k osmotické stabilitě membrány (mykoplasmata snášejí izotonické prostředí, na rozdíl od osmoticky labilních *L - forem* bakterií). Proto mykoplasmata živočichů vyžadují k růstu na kultivačních půdách steroly (přídavek séra). Na rozdíl od ostatních bakterií mykoplasmata nemají a nejsou schopna tvořit peptidoglykan a další složky rigidní buněčné stěny (v genomu chybí informace pro jejich syntézu).⁽²⁴⁾

Díky nepřítomnosti buněčné stěny je morfologie mykoplasmat velmi pestrá; mohou mít tvar kulovitý, ovoidní, prstencovitý nebo lze pozorovat i vláknité či korálkovité útvary. Velikost jednotlivých buněk se pohybuje od 0,1 do 0,3 μm , proto jsou také mykoplasmata schopna procházet póry bakteriologických filtrů o průměru nejméně 0,25 μm .

1.2.2 Řád *Acholeplasmatales*

Zástupci řádu *Acholeplasmatales* nevyžadují, na rozdíl od ostatních příslušníků třídy Mollicutes, ke svému růstu přítomnost sterolů. Vyskytují se běžně v půdě, na rostlinách a osidlují i různé živočichy. Často kolonizují média se sérem určená k příprav tkáňových kultur. Pouze jediný druh, totiž *Acholeplasma laidlawii*, bývá pravidelně nacházen v klinickém materiálu pocházejícím od lidí a různých druhů primátů. U člověka bývá tento druh prokazován ve vzorcích materiálu z dutiny ústní, dýchacích cest a urogenitálního traktu. *A. laidlawii* pravděpodobně nehraje žádnou významnou roli při onemocněních člověka, zato se zřejmě uplatňuje jako patogen hmyzu a rostlin.⁽²³⁾

1.3 Množení

Příslušníci rodu *Mycoplasma* jsou nejmenší známé prokaryoty, které jsou schopné autonomního množení a růstu na buněčných mediích. Nejmenší životaschopné buňky mají rozměry 100 nm, kultury mykoplasmat však obsahují buňky různých velikostí (až 1 μm) a formy vláknité. Mykoplasmata mají nejmenší genom ze všech bakterií (jen 5, 10⁸ daltonu – asi 1/5 genomu *E. coli*). Důsledkem omezené genetické informace je omezená biosyntéza, takže mykoplasmata mají značné nutriční nároky pro růst.⁽³⁾

Mykoplasmata se dělí binárně. Dělení cytoplazmy následuje dlouho po replikaci genomu, takže vznikají mnohojaderná vlákna. Poté co se cytoplasma rozdělí zaškrcováním membrány v místech mezi dvěma genomy, tvoří se korálkovité řetízky, jež se dále fragmentují, a vznikají jednotlivé buňky. Buňka také může pučet, jestliže se dvě dceřiné buňky cytoplazma nerozdělí rovnoměrně.⁽²³⁾ Tento replikační cyklus, který způsobuje nápadnou pleomorfii Mykoplasmat, je podmíněn jak druhem organismu, tak růstovou fází a zevními podmínkami.⁽³⁾

Nejmenší jednotka mykoplasmatu schopná reprodukce je přibližně kulovitá, o průměru 200 – 250 nm. Z mikrobiálních buněk této velikosti a jakéhokoli tvaru začíná kultura růst na umělých půdách. Buňky dorůstají do větších forem o průměru 0,5 – 1,0 μm, které tvoří základ charakteristických kolonií, jež vrůstají do agaru.

Mykoplasmata jsou citlivá na vyschnutí a na teplotu nad 50 °C. Dobře však přežívají v aerosolu, kterým se můžou šířit. Jsou poškozována povrchově aktivními látkami a tukovými rozpouštědly.⁽³⁾

1.3.1 Identifikace Mykoplasmat a Ureaplasmat

Kolonie mykoplasmat a ureaplasmat nejsou na pevných půdách viditelné pouhým okem a je tedy nutné pozorovat je pod mikroskopem za využití středního zvětšení (objektiv 20 nebo 40). Uvedené mikroorganismy vytvářejí na pevných půdách kolonie zhruba trojího typu:

1. Velké kolonie (průměr 50 – 300 μm) vzhledu sázeného vejce, tj. se zahuštěným tmavším středem (*M. hominis* a některé další druhy)
2. Menší, homogenně zrnité kolonie cca 100 μm s úzkým světlejším okrajem (*M. pneumoniae*).
3. Velmi drobné (50 μm) hnědavé, homogenně zrnité kolonie (*U. urealyticum*).

Odlišení *M. hominis* a *U. urealyticum* lze provést již přidáním vhodného substrátu a indikátoru (argininu v případě *M. hominis* a urey v případě *U. urealyticum* do pevného nebo tekutého média.⁽²⁴⁾

1.4 Morfologie

Struktura a metabolismus buněk jsou velmi jednoduché.⁽³⁾ V elektronovém mikroskopu jsou po negativním barvení patrné stejné morfologické znaky jako v mikroskopu světelném. Některá mykoplasmata, včetně *Mycoplasma genitalium* a *Mycoplasma pneumoniae* izolovaných z člověka, mají zvláštní struktury na jednom nebo obou koncích, jimiž se přichycují na sliznici respiračního či genitálního traktu viz obrázek č. 1.

Obrázek č. 1: Elektronoptický snímek negativně zbarveného *Mycoplasma genitalium*.⁽¹⁷⁾



Mykoplasmata postrádají mnoho genů, včetně těch pro syntézu buněčné stěny a syntézu všech 20 aminokyselin, také geny kódující enzymy pro citrátový cyklus a většinu dalších biosyntetických genů.⁽²⁸⁾

Buňka je delimitována membránou o šířce 7,5 až 10 nm, jež má mezi dvěma elektroopticky hutnými vrstvami řídkou průsvitnou vrstvu. Některé druhy mají vně membrány vrstvu vzhledu hutného pouzdra, jež například u *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides* obsahuje galaktan. Jiná mykoplasmata, například *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pulmonis* a *Spiroplasma citri*, mají na povrchu ostré výběžky, poněkud širší, než jaké mají virové partikule myxovirů, jež jsou pravděpodobně nástroji adherence na eukaryotní buňku. *Mycoplasma gallisepticum* a *Mycoplasma pneumoniae* adherují na receptory z kyseliny neuraminové. Těsné přilnutí na buňku umožňuje mykoplasmatům vpravit do buňky nukleázy a další enzymy a získat tak pro sebe produkty enzymového štěpení, například nukleotidy. Adherence na erythrocyty (*hemadsorpce*), buňky v buněčné kultuře, spermatozoa a jiné eukaryotní buňky se prokazuje kápnutím suspenze těchto buněk na kolonii mykoplasmat.⁽¹⁰⁾

Elektronopticky řídká část membrány obsahuje lipidy s mastnými kyselinami o dlouhých řetězcích obrácených dovnitř a s polárními skupinami vně i dovnitř buňky. Elektronopticky hutné vrstvy se skládají z bílkovin a polysacharidů. Na membráně probíhají metabolické reakce zprostředkované enzymy vázanými na membránu a transportními mechanismy. Mezi molekuly fosfolipidu je vmezeřen cholesterol nebo karotenoid/karotenol. Protože není vytvořena rigidní buněčná stěna jako u ostatních bakterií, má význam pro zachování integrity membrány při změnách vnějšího osmotického tlaku. Přítomnost cholesterolu však činí buňku citlivou k saponinu, digitoninu a některým polyenovým antibiotikům (filipinu, amfotericinu B), jež tvoří s cholesterolem komplex.

Cytoplasma mykoplasmat neobsahuje endoplasmatické retikulum, jsou v ní ribosomy a rozptýlená nebo centrálně lokalizovaná jaderná substance ve fibrilární formě o síle 3 nm. Ribosomy mají sedimentační konstantu 70S a, stejně jako u bakterií,

tetracyklin, aminoglykosidy, erytromycin a chloramfenikol na nich inhibují syntézu bílkovin.

Obsah DNA kolísá od 1,5 do 4 % suché hmotnosti. Molekulová hmotnost nejmenšího genomu mykoplasm (45 MDa) je o něco větší než u velkého poxviru (20 MDa). Je to nejmenší obsah genetické informace nutný pro nezávislou existenci množím mimo buňku. Je to také důvod, proč jsou mykoplasmata málo biochemicky aktivní, a proto náročná na výživu.⁽¹⁰⁾

1.4.1 Antigenní vlastnosti

Analýza DNA přispěla zásadním způsobem k taxonomii mykoplasm. Nicméně identifikace a klasifikace druhů stále spočívá v protilátkové odpovědi, která odráží jejich antigenní strukturu. Metoda Western-blotu představuje nový přístup k poznání jednotlivých antigenů. Vyšetření genovou difuzí a imunoelektroforézou specifickými antiséry je důležité pro určení antigenní struktury mykoplasm a zjištění jejich příbuznosti. Pro epidemiologické studie sérologickými metodami a pro sérologickou diagnostiku se používají citlivější testy, jako je nepřímá hemaglutinace a ELISA.⁽¹⁰⁾

1.5 Infekce způsobující urogenitální mykoplasmata

1.5.1 Urogenitální infekce

Uretrální infekce vyvolávají především chlamydie, mykoplasmata, trichomonády, a gonokoky.⁽²⁾

Z urogenitálního traktu bylo izolováno 7 druhů mykoplasm (*Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma primatum*, *Mycoplasma salivarium*, *Mycoplasma spermatophilus*) a *Ureaplasma urealyticum*. *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* se vyskytují nejčastěji.⁽¹⁰⁾

Druhy *M. hominis* a *U. urealyticum* bývají často izolovány z urogenitálního traktu i klinicky zcela zdravých osob, u žen dokonce ve 35-80% případů. Z klinického

materiálu pocházejícího od mužů bývá *M. hominis* izolováno v 0-13%, *U. urealyticum* pak v 5-56% případů. Při uplatnění všech mikrobů této skupiny v onemocněních člověka hraje nepochybně významnou roli celá řada podpůrných faktorů, jako je věk, pohlavní aktivita, počet sexuálních partnerů, sociálně-ekonomické zázemí apod. ⁽¹³⁾

1.5.2 Nagonokoková uretritida (NGU)

M. genitalium je považováno za nejčastější příčinné agens působící uretritidu bez přítomnosti bakterií *Neisseria gonorrhoeae* (NGU) a *Chlamydia trachomatis* (NCU). ⁽¹²⁾ Patogenní organismy pocházejícího ze zevního genitálu, se do uretry dostávají ascendentně jednak pohlavním, jednak nepohlavním přenosem. U pacientů s chronickým reziduem moči na podkladě subvezikální obstrukce je možná infekce močového systému typickými močovými mikroby. S tím se setkáváme zejména u mužů vyšších věkových skupin. ⁽²⁾

Mycoplasma hominis se izoluje asi u jedné pětiny případů NGU. Je mnoho důkazů, že jedním původcem NGU, která není chlamydiová, je zřejmě *Ureaplasma urealyticum*. Důkaz pochází z naočkování dobrovolníků a zvířat, z pozorování pacientů se sníženou imunitou, ze sérologických studií a z kontrolovaných studií antibiotické léčby. Po naočkování onemocněli lidé i zvířata. Jaká část NGU připadá na ureaplastmovou etiologii, není jasné, ale jejich přítomnost v uretře u mužů bez příznaků napovídá, že patogenní jsou možná jen některé sérotypy nebo že u pacientů hraje roli nějaký predispoziční faktor, jako je snížená slizniční imunita. Není prokázáno, že by ureaplastmata způsobovala akutní prostatitidu, ale jejich izolace z aspirátu z nadvarlete pacientů trpících epidydimitidou, která není chlamydiová ani gonokoková, a protilátková odpověď nasvědčuje tomu, že příležitostně toto způsobovat mohou. *Ureaplasma* není příčinou mužské sterility.

1.5.3 Močová infekce a litiáza

Mycoplasma hominis bylo izolováno z horního močového ústrojí u pacientů s příznaky akutní pyelonefritidy. U těchto pacientů byly též prokázány protilátky. *Mycoplasma hominis* je příčinou pyelonefritidy asi v 5 % případů. Ureaplasmata u tohoto onemocnění etiologickou roli nehrají. Protože produkují ureázu, v moči in vitro napomáhají krystalizaci struvitu a kalciumfosfátu a v experimentu na zvířeti způsobují tvorbu močových kaménků, naskytá se otázka, zda nezpůsobují u člověka litiázu. Ureaplasmata jsou v moči a konkrementech u pacientů s infikovanými kameny častější než u pacientů s metabolickými kameny. Nasvědčuje to jejich etiologické úloze.

1.5.4 Onemocnění pohlavních orgánů u ženy a následky infekce

Mycoplasma hominis, a v menší míře i ureaplasmata, jsou častěji izolována u pacientek s bakteriální vaginózou než u zdravých žen. Spolupůsobí s jinými bakteriemi na vzniku bakteriální vaginózy. Uretrální syndrom zřejmě nevyvolávají.

Mycoplasma hominis je v malém počtu případů pravděpodobným agens hlubokého pánevního zánětu (PID – pelvic inflammatory disease). Z postižených vejcovodů byla také izolována ureaplasmata. Jsou však původcem této infekce velmi nepravděpodobně, neboť není sérologická odezva a v pokusech na primátech salpingitidu nevyvolávají. Neplodnost zřejmě ureaplasmata nezpůsobují.

1.5.5 Onemocnění v těhotenství a infekce novorozenců

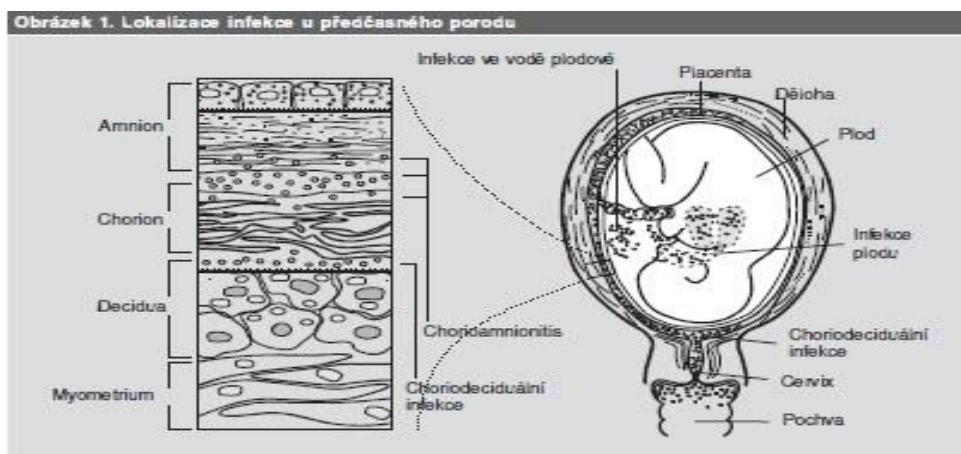
Mycoplasma hominis a ureaplasmata byla izolována z amniové tekutiny u žen s těžkou chorioamnionitidou, které předčasně porodily. Ureaplasmata byla také izolována z potracených plodů a předčasně porozených novorozenců častěji než při přerušení těhotenství nebo z novorozenců narozených v termínu. Ureaplasmata byla izolována z vnitřních orgánů potracených plodů, při čemž byla prokázána protilátková odpověď. Spolu s menším výskytem nálezů při terapii antibiotiky to dokazuje, že ureaplasmata mohou vyvolat potrat. Otázka, zda potrat nastane, protože ureaplasmata

pronikla do plodu, či zda plod zemře z jiné příčiny a mikrobi do něj proniknou poté, zůstává nezodpovězena. Právě tak je zde otázka, zda mykoplasmata, zejména ureaplasmata, jsou příčinou nízké porodní hmotnosti jinak zdravých novorozenců. Vztahu ureaplasmat k nízké porodní hmotnosti nasvědčují sérologická data a studie, při nichž novorozenci žen, jimž byl ve 3. trimestru podáván erytromycin, byli větší než novorozenci, jejichž matkám bylo podáváno placebo. Není vyloučeno, že ženy predisponované k porodu dětí o menší hmotnosti jsou z neznámých příčin snáze kolonizovány. U předčasně porozených dětí invadují *Mycoplasma hominis* a ureaplasmata snáze v prvních třech dnech do mozkomíšního moku a způsobují meningitidu.

Ukazuje se, že *Mycoplasma hominis* někdy vyvolává horečku, neboť bylo v 10 % izolováno z krve febrilních těhotných žen, z nichž polovina měla specifické protilátky. Nebylo izolováno u žen s febrilním potratem ani u žen s normálním těhotenstvím. Navíc, *Mycoplasma hominis* bylo izolováno v 5 – 10 % u žen s poporodní horečkou, velmi vzácně z krve afebrilních žen. Podobná pozorování byla s Ureaplasmaty a zdá se pravděpodobné, že oni mikrobi jsou příčinou horečky a endometritidy. ⁽¹⁰⁾

Mikroorganismy pronikají ascendentně z pochvy a cervixu do děložní dutiny. Vyvolávají zánět deciduy a chorioamniitidu. Chorioamniitida může progredovat, infikuje se plodová voda a plod až do obrazu fetální sepse viz obrázek č. 2. ⁽²⁰⁾

Obrázek č. 2: Lokalizace infekce u předčasného porodu ⁽²⁰⁾



1.5.6 Zánět plodových blan

U druhu *U. urealyticum* byla *in vitro* prokázána schopnost produkce fosfolipasy. To by pravděpodobně vysvětlovalo předpokládanou významnou roli ureaplasmat při vzniku zánětu plodových blan a od něj se následně odvíjející perinatální morbidity, případně i mortality. Hlavním mechanismem se zde jeví produkce kyseliny arachidonové jako významného aktivátoru syntézy prostaglandinů. Fosfolipasy ureaplasmat se zřejmě také s vysokou pravděpodobností uplatňují při vzniku fatálních plicních onemocnění nedonošených novorozenců. Buňky močového epitelu by mohla poškozovat i produkce čpavku při hydrolýze močoviny ureasou.

Předčasný odtok plodové vody, definovaný jako porušení integrity plodových obalů s odtokem plodové vody předcházející minimálně 2 hodiny nástupu děložní činnosti, komplikuje zhruba 4-7 % všech porodů a je přímo spojen s nižším gestačním stářím plodů i vzestupem perinatální a maternální morbidity.

Genitální mykoplasmata patří mezi nejčastější mikroorganismy, jež jsou izolovány z placenty, plodových obalů a plodové vody u těhotných žen s histologicky verifikovanou chorioamniitidou. Tyto mikroorganismy jsou také nalézány intraamniálně při předčasných porodech a při předčasném odtoku plodové vody. Ve většině těchto případů však běžná anaerobní a aerobní kultivace nepřináší odpověď na otázku, jaká jsou infekční agens zodpovědná za tento patologický stav.

Předčasný porod po předčasném odtoku plodové vody (PPROM – preterm premature rupture of the membranes) je signifikantně spojen se zvýšenou koncentrací prostaglandinů v plodové vodě. Příčinou této elevace je nejspíše infekce. Mikrobiální invaze do dutiny děložní je nalezena ve zhruba 30 % případů pacientek s PPRM. ⁽¹³⁾

1.5.7 Infekce novorozenců

Mycoplasma hominis a ureaplasmata způsobují občas respirační infekci novorozenců, zejména pokud mají velmi nízkou porodní hmotnost. Infekci aktivují *in utero*. Kojenci o hmotnosti menší než 1000 g s ureaplasmovou respirační infekcí

vzniklou do 24 hodin mají dvakrát větší riziko úmrtí nebo chronického plicního onemocnění než kojenci o stejné či vyšší hmotnosti, kteří nejsou infikováni. ⁽¹⁰⁾

1.5.8 Infekce pacientů se sníženou imunitou

Obecně u dospělých osob s intaktním a funkčním imunitním systémem mykoplasmová infekce vzhledem k nízké virulenci neprogreduje v těžkou infekci, ale mikrob se stává komensálem. (24)

U některých pacientů s hypogamaglobulinemií mají mykoplasmové infekce urogenitálního traktu zánět kloubů. U některých pacientů, je zánět kloubů spojen s podkožními abscesy, přetrvávající uretritidou a chronickou cystitidou. Ačkoli příznivě reagují na léčbu tatreacyklinovými antibiotiky, přetrvává onemocnění a původci měsíce, i když se antibiotická terapie doplní protizánětlivou léčbou a γ - globuliny. *Mycoplasma hominis* bylo identifikováno jako příčina sepse po traumatu a po výkonech na urogenitálním traktu. Mykoplasmata byla nalezena v mozkových abscesech a v kostní dřeni při osteomyelitidě. Hematogenní rozsev a následná septická artritida, infekce ran po chirurgickém zákroku a peritonitida vznikají téměř výhradně u výrazně imunokompromitovaných pacientů, např. po transplantaci orgánů či u pacientů při imunosupresivní terapii. Relativně časté jsou rané infekce sternu způsobené *Mycoplasma hominis* u pacientů po transplantaci srdce a plic. ⁽¹⁰⁾

1.6 Diagnostika a léčba

Při diagnostice a léčbě se můžeme setkat s řadou obtíží. ⁽¹⁷⁾ Dle doporučení WHO (World Health Organization) průkaz mykoplasmat v organismu neopravňuje k léčbě bez přítomnosti klinických příznaků. ⁽²⁵⁾ Někteří pacienti mají příznaky jen velmi mírné. Nemalá část pacientů je zcela asymptomatická a k záchytu dojde v rámci vyšetření při onemocnění sexuální partnerky či partnera. ⁽¹⁸⁾

Dalším problémem zůstává i nedostatečná spolupráce s nemocným a jejich partnery a značná kontagiozita těchto infekcí. ⁽²¹⁾ Setkáváme se s neochotou dodržovat chráněný pohlavní styk s kondomem či sexuální abstinenci. Partneři se nedostavují k vyšetření a

léčbě. Dle zkušeností se hlavně muži vyhýbají provedení odběru uretrálního sekretu a buněčného detritu i moderními odběrovými sety pro uretrální dyskomfort spojený s odběrem. Tato problematika je v současnosti částečně vyřešena možností použít vyšetření bez nutnosti odběru z uretry. K průkazu se používají například metody PCR (Polymerase Chain Reaction), LCR (Ligase Chain Reaction) z první porce nejlépe ranní moči – z moči je ovšem nižší záchytnost. Dalším problémem již při prokázané STD (Sexually Transmitted Diseases) je při současném častém používání antibiotik výskyt alergických reakcí, gastrointestinální intolerance či vznik rezistentních mikrobiálních kmenů.⁽¹⁷⁾

V roce 2003 studie kolektivu Domingues a kol.⁽⁸⁾, zabývající se výskytem genitálních mykoplasm a jejich citlivosti k antibiotikům používaných k léčbě infekce, uvádějí rezistenci k erythromycinu dokonce u 91 % kmenů *M. hominis*. Oproti tomu se ve studii o rok později podařilo kolektivu Kilic a spol. zaznamenat mnohem nižší hodnotu rezistentních kmenů, a to 50 %.⁽⁸⁾

Jak lze očekávat, mykoplasmata jsou zcela rezistentní k penicilinům a ostatním antibiotikům inhibujícím syntézu buněčné stěny.⁽¹⁰⁾

Chlamydie jsou častějšími původci NGU než mykoplasmata, takže nemocné je nutno léčit tetracykliny. Asi 10 % ureaplasm je rezistentní k tetracyklinu, takže v těchto případech není léčba úspěšná a pacienti musí být léčeni erytromycinem, k němuž jsou citlivá i ureaplasmata rezistentní k tetracyklinu. Tetracyklin, k němuž jsou chlamydie i *Mycoplasma hominis* citlivé, je vhodný i pro léčbu PID způsobené citlivými původci. Avšak asi 20 % kmenů *Mycoplasma hominis* je k tetracyklinu rezistentní a pak přicházejí v úvahu jiná antibiotika.⁽¹⁰⁾ Důležité je vždy dostatečné dávkování a hlavně přiměřená délka léčby (obvykle tři týdny).⁽¹³⁾

1.7 Diagnostické metody

Klinický materiál se odebírá dle druhu onemocnění a metody stanovení mykoplasmat, vždy před léčbou antibiotiky. ⁽³⁾

1.7.1 Nepřímý průkaz

Nepřímá diagnostika urogenitálních mykoplasmat pomocí sérologických metod se v rutinním vyšetření nevyužívá pro obtížnou interpretaci pozitivních i negativních nálezů. Pro jejich detekci jsou běžně využívány přímé metody zejména průkaz biochemické aktivity *U. species* a *M. hominis* či detekce specifické části jejich DNA (Deoxyribonucleic Acid) pomocí PCR metody.

Dříve užívané, nespecifické a málo citlivé testy (chladové aglutininy aj.) se dnes již pro diagnostiku nedoporučují. ⁽⁶⁾

1.7.2 Přímý průkaz

Materiálem zasílaným k přímému průkazu *M. pneumoniae* bývají většinou laváže z bronchů, sputum nebo stěry z horních cest dýchacích, případně likvor, krev nebo vzorky tkání. Tampony s odebranými výtěry je bezpodmínečně nutné ukládat do transportního média (nejčastěji do Amiesovy transportní půdy). Totéž platí i o výtěrech z urogenitálního traktu zasílaných k vyšetření na přítomnost *M. hominis* a *U. urealyticum* i *M. genitalium*. Kromě toho lze urogenitální mykoplasmata dobře izolovat i ze vzorků moče nebo z prostatického exprimátu po předchozí masáži.

1.7.3 Přímá mikroskopie

Díky nepřítomnosti kompletní buněčné stěny se mykoplasmata Gramovou metodou prakticky nebarví, je však možno užít barvení podle Giemsy (v praktické diagnostice se ale mikroskopický průkaz buněk mykoplasmat běžně nepoužívá).

1.7.4 Kultivace

Vyšetřuje se sekret z postižených sliznic, sperma, eventuálně moč. ⁽⁹⁾ Vyšetření výtěrů z močové trubice nebo pochvy je o něco citlivější než vyšetření moče. ⁽¹⁰⁾

Kultivace se provádí jak v půdách tekutých, tak na agarových plotnách. ⁽³²⁾ Oba rody vyžadují půdy obohacené o prekursory nukleových kyselin a steroly. Většina užívaných kultivačních medií proto obsahuje pepton, kvasničný extrakt a zvířecí sérum, které slouží především jako zdroj cholesterolu. ⁽³¹⁾ Do kultivačních půd je nutno přidávat antibiotika za účelem potlačení ostatní bakteriální mikroflóry eventuálně přítomné ve vyšetřovaném vzorku. Nejčastěji se doporučuje polymyxin B, některý aminoglykosid a z antimykotik amfotericin B. ⁽³²⁾

U přímého průkazu mykoplasm a ureaplasm se nejčastěji využívá i jejich biochemické aktivity. V praxi jsou běžně užívána pomnožovací tekutá média s argininem (pro důkaz *M. hominis*), ureou (k záchytu *U. urealyticum*) nebo pevné agarové půdy s glukosou (k izolaci *M. pneumoniae*). ⁽³¹⁾

Tyto půdy obsahují mimo jiné indikátory reagující na rozklad daného substrátu změnou barvy (většinou do červena). Obdobně se projeví barevnou změnou i nárůst *M. pneumoniae* na půdě s glukózou (zežloutnutí původně lososově růžového média). ⁽³²⁾ Protože mykoplasmata při svém růstu bujon nekalí, přidává se pro detekci jejich množení v tekuté půdě indikátor pH. ⁽³¹⁾

Kultivace mykoplasm a ureaplasm se obvykle provádí v mikroaerofilním prostředí při teplotě 37 °C. Řada kmenů je však schopna vyrůstat i v aerobní atmosféře.

Doba, za kterou se vytvářejí kolonie na pevných půdách, je u různých druhů mykoplasm různá. Zatímco *M. pneumoniae* vyrůstá za 4-21 dní (obvykle doporučená délka inkubace je 10 dnů), urogenitální mykoplasmata mají dobu kultivace poněkud kratší – *M. hominis* vyrůstá za 5 - 8 dní, *U. urealyticum* za 5 – 7 dní. Doporučená délka inkubace pevných půd je proto pro oba druhy 1 týden.

1.7.5 Identifikace mykoplasmat a ureaplasmat

Kolonie mykoplasmat a ureaplasmat nejsou na pevných půdách viditelné pouhým okem a je tedy nutné pozorovat je pod mikroskopem za využití středního zvětšení (objektiv 20 nebo 40). Uvedené mikroorganismy vytvářejí na pevných půdách kolonie zhruba trojího typu:

1. Velké kolonie (průměr 50 – 300 μm) vzhledu sázeného vejce, tj. se zahuštěným tmavším středem (*M. hominis* a některé další druhy)
2. Menší, homogenně zrnité kolonie cca 100 μm s úzkým světlejším okrajem (*M. pneumoniae*).
3. Velmi drobné (50 μm) hnědavé, homogenně zrnité kolonie (*U. urealyticum*).

Odlišení *M. hominis* a *U. urealyticum* lze provést již přidáním vhodného substrátu a indikátoru (argininu v případě *M. hominis* a urey v případě *U. urealyticum* do pevného nebo tekutého média. ⁽³²⁾

Kultivační metody nejsou v rutinních laboratořích běžně využívány. Důvodem je citlivost těchto bakterií, vysoké podmínky a nároky na kultivační média, včetně pomalého růstu.

V současné době nabízí testy pro detekci urogenitálních mykoplasmat řada firem. Některé diagnostické soupravy umožní pouhou identifikaci některých druhů urogenitálních mykoplasmat, u některých je možná diferenciální titrace, někdy je možné stanovovat i citlivost na vybraná antibiotika.

V současné době narůstá význam přímého průkazu DNA patogenů technikami PCR a real-time PCR. ⁽²⁵⁾

1.7.6 MycoView®

Test na stanovení přítomnosti a citlivosti na ATB urogenitálních mykoplasmat.

Soupravu vyrábí francouzská firma Zeakon Diagnostics a na český trh dodává pražská firma JK-Trading s.r.o.

MycoView test umožňuje identifikaci a diferenciaci a semikvantitativní titraci dvou druhů urogenitálních mykoplasmat: *Ureaplasma spp. (urealyticum a parvum)* a *Mycoplasma hominis* z různých urogenitálních vzorků. Testem lze stanovit i rezistenci na devět druhů ATB (viz Tab. 1).⁽²³⁾

Tab. 1 Složení ATB v MycoView stripu⁽²³⁾

Jamka číslo:	Zkratka	ATB
1	C	Růstová kontrola
2	U.u.	Identifikace U. u. ze vzorku od $a \geq 10^4$ CCU/ml vzorku
3	M.h.	Identifikace M. h. ze vzorku od $a \geq 10^4$ CCU/ml vzorku
4	L	Rezistence na linkomycin
5	E	Rezistence na erythromycin
6	ROX	Rezistence na roxythromycin
7	AZM	Rezistence na azithromycin
8	JM	Rezistence na josamycin
9	MNO	Rezistence na minocyklin
10	DO	Rezistence na doxycyklin
11	OFX	Rezistence na ofloxacin
12	NOR	Rezistence na norfloxacin

1.7.6.1 Princip stanovení

Identifikace *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis* je založena na průkazu produktů jejich metabolismu.⁽¹⁶⁾ MycoView test je založený na rozdílných metabolických vlastnostech a přirozené rezistenci mykoplasmat:

- *U. u.*: Hydrolysuje ureu a je rezistentní na linkomycin
- *M. h.*: Hydrolysuje arginin a je rezistentní na erythromycin

Růst obou kmenů je vizualizovaný barevnou změnou pH indikátoru ze žluto-oranžové na červenou nebo růžovou. ⁽²³⁾

Vzorky je potřeba odebrat do speciálního média vhodného pro transport urogenitálních mykoplasmat. Jedná se o tekuté médium T - Broth, jež obsahuje PPLO medium a antibiotika, která jsou specializovaná pro urogenitální mykoplasmata.

1.7.7 Diagenode *Mycoplasma genitalium* Real Time PCR kit

Souprava pochází od belgické firmy. Dodavatel Diagenode je zastupující firma v České republice.

Diagenode *Mycoplasma genitalium* Real Time PCR kit je kit určený pro testování ve výzkumu ve smyslu detekce tohoto patogenu. Tento kit je navržen pro detekci *Mycoplasma genitalium* ve vzorcích moči nebo stěrech děložního čípku. Více o této diagnostické soupravě viz níže.

1.7.8 PCR

Průkaz specifické DNA pomocí molekulárně genetických metod PCR technologie je dnes základní výzkumnou a diagnostickou metodou v biomedicině. ⁽³⁾ Nejčastěji používanou metodou pro amplifikaci je polymerázová řetězová reakce. Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla vyvinuta v Cetus Corporation v Emeryville v Kalifornii. Principem je enzymatická amplifikace DNA in vitro syntézou mnoha kopií vybrané sekvence DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích. Metoda PCR se již běžně využívá i v rutinních mikrobiologických laboratořích. Uplatňuje se zejména v situacích, kdy infekční agens roste pomalu, kultivuje se nebo identifikuje obtížně, příp. se kultivovat zatím nedá. ⁽³²⁾

Genetické metody se užívají v řadě oblastí medicíny, v mikrobiologii hlavně při detekci infekčních mikroorganismů přímo z biologických materiálů, identifikaci jednotlivých druhů z kultivačních médií, detekce mutací spjatých s rezistencí na

antibiotika či v oblasti epidemiologické (porovnání podobnosti vybraných kmenů z populace, atd.).

1.7.8.1 Princip metody

Reakce je založena na schopnosti dvouvláknové DNA denaturovat při vysoké teplotě a opětovně renaturovat po jejím snížení za zachování pravidla komplementarity bází. Jestliže jsou známy nukleotidové sekvence na koncích určitého regionu DNA, je možno celý tento úsek amplifikovat pomocí této polymerázové řetězové reakce.

Metoda PCR neboli polymerázová řetězová reakce slouží k namnožení úseků DNA. První krok začíná tepelnou denaturací DNA vlivem vysoké teploty (okolo 95°C) na jednoduché řetězce. Další fáze je ochlazení vzorku na 50 – 60°C, dochází k navazování primerů na komplementární 3'konce cílové DNA. Primery neboli sondy jsou komplementární k vybranému cílovému místu, který chceme amplifikovat. Ve třetím kroku je DNA polymeráza (izolované z bakterie *Thermus aquaticus*, která žije v horských minerálních pramenech) napojena na řetězec, která prodlužuje vlákna DNA směrem od obou primerů, ve směru od 5'konce ke 3'konci při 72°C. Po dokončení syntézy se zkumavka s PCR reakcí zahřívá opět na 95 °C, dochází k denaturaci nově vytvořených DNA duplexů a poté se celý cyklus opakuje. Opakování cyklů vede k rychlému namnožení cílové DNA.

Podmínkou pro provedení PCR je příprava oligonukleotidových sond, které specificky hybridizují na obou koncích cílového úseku DNA a slouží jako základ pro tvorbu nových vláken. Syntéza primerů o požadované sekvenci dnes probíhá na automatizovaných přístrojích a není finančně nákladná.

1.7.9 Kvantitativní PCR v reálném čase

Tato technika je založena na použití fluorescenčně značených sond a detekčního systému, který je schopen měřit intenzitu fluorescence. Intenzita fluorescence je úměrná množství PCR produktu a pomocí standardní křivky sestavené při použití známých

množství cílové DNA je možné přesně kvantifikovat množství cílové DNA v biologickém vzorku.

1.7.9.1 Princip metody

Oligonukleotidová sonda, označená dvěma fluorochromy, nasedá na sekvenci uvnitř PCR produktu. Fluorochrom na 5' konci je označován jako reporter a 3' fluorochrom jako zhášec. Jestliže jsou oba fluorochromy přítomny na jedné molekule DNA, nedochází k žádnému vyzařování fluorescence. V okamžiku, kdy Taq polymeráza zahájí další kolo syntézy, dochází k degradaci sondy a reporterový fluorochrom je uvolněn ze zhasnutého stavu. Intenzita fluorescence je monitorována kontinuálně během amplifikačního procesu. Intenzita fluorescence tedy přímo odpovídá množství PCR produktu v reakci. PCR v reálném čase je poměrně nenáročná na provedení a je vysoce reprodukovatelná. Další výhodou je možnost najednou analyzovat velké množství vzorků.⁽³⁾

Pro PCR diagnostiku mykoplasmat existuje již mnoho rutinně nabízených diagnostických souprav, jež lze aplikovat na různé přístroje na trhu dostupné pro provádění Real - Time PCR metod.

2. Cíl práce

Cíle mé bakalářské práce byly:

- Vyzkoušet metodiku diagnostiky urogenitálních mykoplasmat a zhodnotit výsledky podle jednotlivých kritérií (pohlaví, věk) za určité období.
- Výsledky porovnat s dostupnou literaturou.

3. Metodika

3.1 Charakteristika souboru

Laboratorní část mé bakalářské práce probíhala v Praze, v Nemocnici Na Bulovce Budínova 67/2, Praha 8, na Oddělení klinické mikrobiologie v laboratoři molekulárně genetických metod pod dohledem MUDr. Šárky Lásikové. Výzkum byl prováděn v šestiměsíčním časovém období od 1. 7. 2014 do 31. 12. 2014, kdy takto zvolené období umožnilo shromáždit vzhledem k finanční náročnosti používaných metod dostatečné množství relevantních výsledků. V tomto období bylo vyšetřeno 423 pacientů na přítomnost *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis* a dalších 159 pacientů na *Mycoplasma genitalium*. Veškeré vyšetření byla prováděna pod odborným dohledem kvalifikovaného pracovníka.

Cílem mé práce bylo pochopení a praktické zvládnutí daných metod. V Nemocnici Na Bulovce se ke stanovení *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis* užívá *MycoView*® test, kterým se zjistí přítomnost a citlivost na ATB urogenitálních mykoplasmat. K detekci *Mycoplasma genitalium* se zde užívá *Diagenode Mycoplasma genitalium Real Time PCR kit*. Výhodou výše zmiňovaných metod je možnost detekovat i velmi malý počet bakteriálních buněk.

Z důvodu osvědčení výše zmíněných testů se zde v laboratoři neprovádí kultivace mykoplasmat na pevných půdách, a to z důvodu příliš dlouhé doby pro růst kmenů a značným růstovým nárokům.

Byly vyšetřovány tyto materiály: výtěr z uretry, výtěr z pochvy, výtěr z hrdla děložního, sperma a moč. Vyšetřovaný materiál byl odebrán především na kožním oddělení, dále na gynekologickém, infekčním, pediatrickém a urologickém. Na tato oddělení poskytuje laboratoř speciální balíčky, které obsahují dacronový výtěrový tampon, transportní medium a žádanku. Pro bezchybné vyšetření je nutný správný odběr. Je nutno, aby na tamponu bylo co možná nejvíce epitelových buněk. Pokud je

vyšetřovaným vzorkem moč, je nutné, aby to byla moč ranní. Nejlépe je moč z prvního proudu, ve kterém je nejvyšší pravděpodobnost vysokého počtu odloučených buněk epitelu. Odebraný vzorek musí být co nejdříve dopraven zpět na centrální příjem laboratoře, vzorek je třeba uchovávat v chladničkové teplotě, kolem 4°C. Součástí musí být vždy řádně vyplněná žádanka s identifikací pacienta a požadované vyšetření.

Po přijetí materiálu na centrální příjem se kontroluje identifikace pacienta na žádance i vzorku. Poté každý materiál dostane své identifikační číslo, které se napíše jak na vzorek.

Označený vzorek je dále poslán na pracoviště, kde bude vzorek laborantkou zpracován.

3.2 Detekce *Mycoplasma genitalium*

Detekce probíhá ve čtyřech krocích: příprava biologického materiálu, izolace DNA, příprava amplifikačního mixu a amplifikace s detekcí po vložení do přístroje. Všechny vzorky byly ihned po přijetí do laboratoře uschovány do lednice při 4°C nejdéle 24 hodin a pro déle trvající skladování musí být zmrazeny na -20°C. Nejdéle do dvou dnů byla provedena izolace DNA, poté proběhla detekce na patogeny. Izolovaná DNA se musí znovu uschovat, pro případ potřeby dalšího diagnostického vyšetření. Před vlastní prací bylo zkontrolováno identifikační číslo pacienta a zároveň stejným číslem označeny i pracovní zkumavky, aby později nemohlo dojít k záměně.

3.2.1 Izolace DNA

Izolace nukleových kyselin z klinických vzorků spočívá v uvolnění DNA z vazby na proteiny a následném odstranění kontaminujících buněčných komponent za účelem zjištění přítomnosti patogenních mikroorganismů pomocí polymerázové řetězové reakce. Mnou využívaný izolační postup purifikace DNA využívá technologie firmy QIAGENE, kdy pomocí proteázy a lyzačního roztoku dochází k lýze klinických vzorků a uvolnění DNA z vazby na buňky a bílkoviny, jejímu zachycení na kolonkové silikonové membráně a několikanásobném promývání promývacími pufrými za účelem zbavení se nečistot s následnou elucí čisté DNA.

Izolace DNA se v laboratoři klinické mikrobiologie Nemocnice Na Bulovce provádí na přístroji QIAcube. Jde o kompaktní automatický izolátor s využitím kolonkových kitů běžně užívaných pro manuální zpracování.

Veškeré kity potřebné k izolaci laboratoř odebírá přímo od firmy QIAGEN, které jsou kompatibilní s izolátorem QIAcube. Pro vlastní izolaci je využita souprava QIAGene DNA blood mini kit. Reagencie potřebné pro izolaci viz. tab. 2.

Tab. 2 Reagencie potřebné pro izolaci ⁽²⁶⁾

1.	Elution buffer AE – promývací pufr
2.	Lysis buffer AL – lyzační pufr
3.	Wash buffer AW1 – mycí pufr
4.	Wash buffer AW2 – mycí pufr
5.	Ethanol
7.	Protease solvent - proteáza

Pufr AW1 a AW2 je nutno naředit etanolem přesně dle návodu. Před každým spuštěním izolátoru je třeba zkontrolovat, zda je v přístroji dostatek špiček a reaglií.

3.2.2 Postup izolace

Příprava vzorků na izolaci DNA byla prováděna za postupných kroků, které jsou níže ve stručnosti popsány.

Stěry:

- Každý výtěrový tampon byl umístěn do sterilní zkumavky, která musí být popsána identifikačním číslem pacienta.
- Do zkumavky bylo přidáno 400 µl injekční vody a vzorek důkladně zvortexován, aby se z tamponu uvolnily epitelové buňky.
- Ze zkumavky bylo poté odpipetováno 200 µl do 2 ml mikrozkuvek, které jsou součástí kitů od QIAGEN.
- Mikrozkuvky byly umístěny do stojanu, který se dává do třepačky adaptéru izolátoru QIAcube.

Moč:

- Stejně jako u stěrů je nutné zkontrolovat ID číslo pacienta.
- Každý vzorek moči byl důkladně zvortexován.
- Do sterilní 2 ml mikrozkuřavky napipetováno 200 μ l moči.
- Mikrozkuřavky byly poté vloženy do stojanu a umístěny do třepačky adaptéru izolátoru.

3.2.3 Vlastní izolace v přístroji

Izolátor ovládá integrované komponenty včetně odstředivky, vyhřívání šejkru, pipetovacího systému či robotická ramena. QIAcube je dodáván s předinstalovanými protokoly pro zpracování genomové DNA, plazmidové DNA, atd. Uživatel si zvolí protokol pomocí dotykové obrazovky.

3.2.4 Příprava vzorku pomocí QIAcube

- Vzorky se lyzují v orbitální třepačce, které v případě potřeby mohou být vyhřívány.
- Každý lyzát se přenesení do adaptéru v rotoru.
- Nukleové kyseliny nebo proteiny se váží na membráně kolony QIAGEN, probíhá čištění, promývání a odstranění kontaminujících látek.
- Kolona je odstředěna a přenesena do mikrozkuřavky. Dochází k eluci purifikovaných nukleových kyselin nebo proteinů.

Jednoduché schéma viz příloha č. 1.

3.2.5 Příprava pro PCR reakci

K provedení PCR reakce pro detekci *Mycoplasma genitalium* se přistoupilo po úspěšné izolaci DNA ze vzorků. K diagnostice byla použita komerčně dostupná diagnostická souprava. S-DiaMG. S použitím této metody je detekována pro *M. genitalium* specifická oblast genu mgpa a mg219. Kit obsahuje interní standard, pomocí kterého je možno účinně sledovat možné inhibice v průběhu PCR amplifikace. Složení diagnostické soupravy viz tab. č. 3.

Tab. č. 3: Složení soupravy pro detekci *Mycoplasma genitalium* ⁽²²⁾

1.	Optima Du Master mix DNA 5×
2.	<i>M. genitalium</i> primery & dvoubarevná sonda (FAM, emise 520 nm)
4.	voda pro PCR
5.	Interní kontrola

Potřebný materiál, který není součástí balení: pipety; sterilní pipetové špičky s filtry, vortex mixér, stolní centrifuga, zkumavky do mikrocentrifugy, PCR 96 jamková destička, Real – Time PCR přístroj.

Jelikož jde o velmi citlivou metodu, je nutno dodržovat určitá opatření:

- Manipulaci se vzorky, izolaci a Real Time amplifikaci je nutno provádět v oddělených místech laboratoře a vždy v bezpečnostních boxech.
- PCR laboratoř (bezpečnostní komora, DNA/RNA extrakční část, povrch stolu, apod.) musí být po každém PCR experimentu vyčištěna vhodnými prostředky.
- Kontaminované kity musí být zneškodněny ve specifickém odpadním koši pro biologický odpad.
- Tento kit nesmí být používán osobami vykazující symptomy nemoci, která je tímto kitem detekována.

- Pozitivní a negativní PCR kontrola musí být provedena u každé PCR reakce.
- Pro všechny PCR směsi je nutno použít aerosol – rezistentní špičky.
- Je nutno nosit rukavice.

V první řadě je nutné si před každou reakcí namíchat reagentie. Optima Du Master Mix je stabilní a aktivní pouze za určitých podmínek. Master Mix je nutno smíchat až ve chvíli, kdy máme připraveny veškeré vzorky. Reagentie musí být uchovávány v temnu při -20°C , které jsou vyndány z mrazáku až těsně před zahájením reakce. Pokud by totiž tento kit byl skladován déle při pokojové teplotě, mohlo by to vést k degradaci primerů/ sond/ pozitivních kontrol.

Pro jednu reakci je nutno smíchat **10 μl** Optima Du Master mix DNA $5\times$, **2,5 μl** *M. genitalium* primery & dvoubarevná sonda, **2 μl** H_2O (pro PCR) **0,5 μl** interní kontroly. Reagentie musí být poté promíchány, aby došlo k homogenizaci.

Do každého běhu se přidává na první pozici umístit 5 μl pozitivní kontrolu a na druhou negativní. Vzorky se pipetují do uzavíratelných zkumavek. Do každé zkumavky tedy bylo pipetováno 10 μl připraveného Master Mixu a 5 μl izolované DNA. Zkumavky se poté uzavřou.

3.2.6 PCR analýza a odečet

Real – Time PCR analýza, byla provedená na systému CFX Connect[™] Real – Time PCR Detection Systém firmy BioRad.⁽⁷⁾ Zkumavky s připravenou reakční směsí, obsahující veškeré potřebné reagentie pro bezproblémový průběh PCR reakce byly vloženy do termocykléru, kde probíhala téměř dvouhodinová reakce. Byl zvolen již přednastavený program, viz Tab. č. 4

Tab. č. 4: Program PCR reakce ⁽²²⁾

Fáze	Popis
1.	2 min 50°C
2.	10 min 95°C
3.	(45 cyklů) 1. krok 15 s 95°C 2. krok 60 s 60°C

Detekce *M. genitalium* probíhá v kanálu FAM s emisním spektrem 520 nm. Výsledná data byla automaticky vyhodnocena formou amplifikační křivky. Amplifikační křivka znázorňuje závislost počtu replikovaných úseků DNA patogenu na čase. Zda vzorek obsahuje patogen či ne by mělo být zřejmé z vytvořené amplifikační křivky.

CFX přístroj je dvoukanálový, s kanály FAM a HEX. Pro negativní kontrolu nesmí být FAM signál pozorován. Pro pozitivní kontrolu musí být FAM signál pozorován při hodnotě Ct/Cp 30 +/- 3,3. Pokud je v kanálu FAM pozorován signál a typický tvar amplifikační křivky, znamená to, že je vzorek pozitivní na *Mycoplasma genitalium*, pokud ne, vzorek je negativní. V kanále HEX sledujeme signál interní kontroly, ten musí být přítomen vždy při správném průběhu PCR reakce. Pokud není přítomen, vzorek je nehodnotitelný. Nejčastější příčinou bývá přítomnost inhibitorů Taq polymerázy v biologickém vzorku.

3.3 Detekce *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis*

Detekce *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis* se v Nemocnici Na Bulovce provádí pomocí diagnostické soupravy Mycoview®. Tento test umožňuje identifikaci a diferenciaci urogenitálních mykoplasmat. Zároveň lze testem stanovit i rezistenci na devět druhů ATB. viz Tab. 1

Souprava obsahuje transportní medium, kultivační medium, stripy, atd. Přesný obsah soupravy viz Tab. č. 5, příloha č. 2.

Tab. č. 5: Obsah soupravy Mycoview®⁽²⁴⁾

Položka	Množství	Skladování
Transportní medium: obsahuje 2 ml tekutého media pro transport vzorku na stanovení urogenitálních mykoplasmat.	20 lahviček	+2/ +8 °C
Kultivační medium: lyofilizované medium obsahující PPLO bujon, kvasniční autolyzát, cystein, substráty (ureu a arginin), obohacovala, koňské sérum, selektivní směs antibiotik a fenolovou červeň	20 lahviček	+2/ +8 °C
MycoView strip: 2 stripy s 12 jamkami – zavřené hliníkovou páskou a vysoušecím prostředkem.	10 setů	+2/ +8 °C
Parafinový olej (6,5 ml)	2	Pokojová teplota
Špičky na automatickou pipetu	20	Pokojová teplota
Tampony pro odběr vzorku	20	Pokojová teplota

Potřebný materiál, který není součástí balení: sterilní zkumavky nebo lahvičky na vzorky; pipety (objem 100 µl); nádoba na kontaminovaný odpad; inkubátor 36± 1 °C; stojánek na inkubaci stripů s víčkem.

3.3.1 Postup práce

Laboratoř na požadavek oddělení poskytuje odběrovou soupravu, která obsahuje odběrový tampon, transportní medium a žádanku. Prvním krokem je naočkování transportního media. Tento krok provádí klinik hned po odběru vzorku. Pro bezchybnou

diagnostiku je důležitý správný odběr. Je nutno, aby na tamponu bylo co možná nejvíce epitelových buněk, které mohou být postižené, odběr má být proto razantní.

Tampon se v mediu (T - Broth) důkladně vytřepe a poté je zlikvidován. Pokud je odebraným vzorkem moč, naočkuje se 200 μ l homogenizované moče do transportního media (T – Broth).

Poté už je nutné naočkované medium co nejdříve dopravit do laboratoře, maximálně však do 24 hodin při 4°C. Po přijetí vzorku do laboratoře bylo kontrolováno, zda souhlasí údaje na žádance s údaji na transportním médiu a přiděleno identifikační číslo pacienta. Dále se pokračovalo v níže popsanych krocích.

- Podle počtu (transportních médií) - vzorků je nutno si připravit stripy a kultivační média (C - Medium). Reagencie je nutné vytemperovat na pokojovou teplotu.
- Naočkované transportní médium (T – Broth) bylo přelito do kultivačního média (C – Medium) a rozpuštěno.
- Barva vzniklého roztoku by měla být žlutá nebo oranžová, (pH 6,6 \pm 0,1).
- Před použitím MycoView proužků je nutno opatrně promíchat inokulační médium 4-5 \times Strip je nutné označit jménem pacienta nebo číslem vzorku. Z proužků byla stažena ochranná fólie tak, aby její koncová část zůstala přilepená.
- Do každé jamky bylo přidáno 100 μ l inokulovaného kultivačního média.
- Do každé jamky byla přidána 1 kapka parafinového oleje a uzavřen proužek přílnavou fólií.
- Zbytkové použité kultivační médium byly odloženy do lednice po dobu 48 h při +2/+8 °C pro případ nutnosti verifikace testu. Vzorky z endocervixu a uretry inkubujeme 24 h při 36 \pm 1°C, poté odečteme výsledky.

3.3.2 Výsledky a interpretace

Výsledek testu je závislý na barevné změně v jednotlivých jamkách stripu. Urogenitální mykoplasmata mění barvu média na červenou, resp. jasně růžovou (alkalické pH). Jestliže médium zůstává v barvě žluté a nebo žluto-oranžové, v jamkách růst urogenitálních mykoplasmata neprobíhá.

3.3.3 Identifikace a diferenciální titrace vzorku urogenitálních mykoplasmata

Je nutno zkontrolovat první jamku; jestliže zde není barevná změna je test negativní. Mycoview® strip viz příloha č. 3.

Identifikace U. u. po 24 h inkubace:

- Jestliže jsou pozitivní jamky číslo 2 a 4, pak vzorek obsahuje *U.u* v signifikantní koncentraci $\geq 10^4$ CCU/ml. (CCU - Color Changing Unit)
- Jestliže je pozitivní jen jamka číslo 4, pak vzorek obsahuje *U.u* v koncentraci $< 10^4$ CCU/ml.

Identifikace M. h. po 24 – 48 h:

- Jestliže jsou pozitivní jamky číslo 3 a 5, pak vzorek obsahuje *M.h* v signifikantní koncentraci $\geq 10^4$ CCU/ml.
- Jestliže je pozitivní jen jamka číslo 5, pak vzorek obsahuje *M.h* v koncentraci $< 10^4$ CCU/ml.

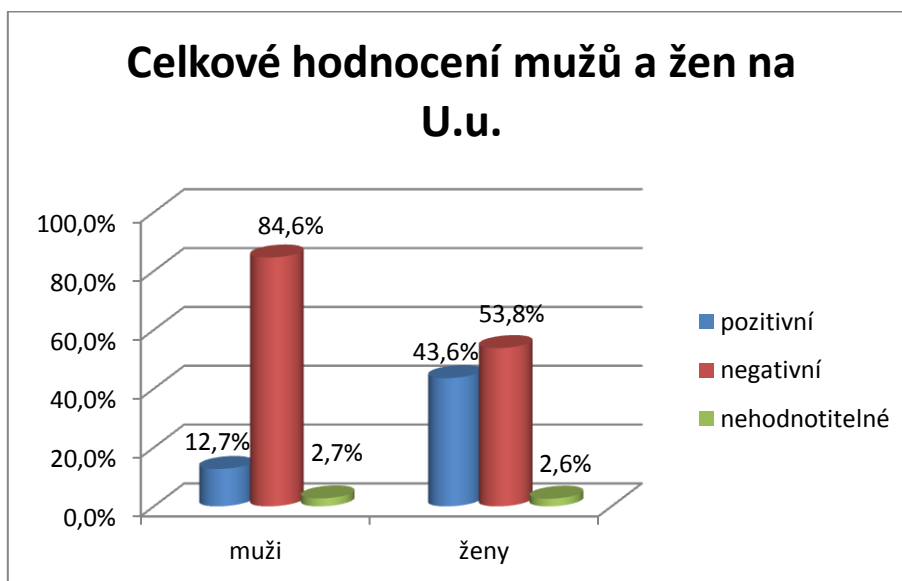
Koncentrace v rozpětí (10^3 - 10^4) CCU/ml jsou považovány za hraniční:

- v případě uretritidy, 10^3 CCU/ml na *U.u* ze vzorku moče
- 10^4 CCU/ml na *U.u* pro vzorky z výtěru uretry u mužů a u žen na *U.u* nebo *M.h* pro endocervikální, nebo vaginální vzorek
- Jestliže test na *Mycoplasma hominis* nevykazoval pozitivní výsledek měl by být odečtený ještě po 48 h inkubaci ⁽²³⁾

4. Výsledky

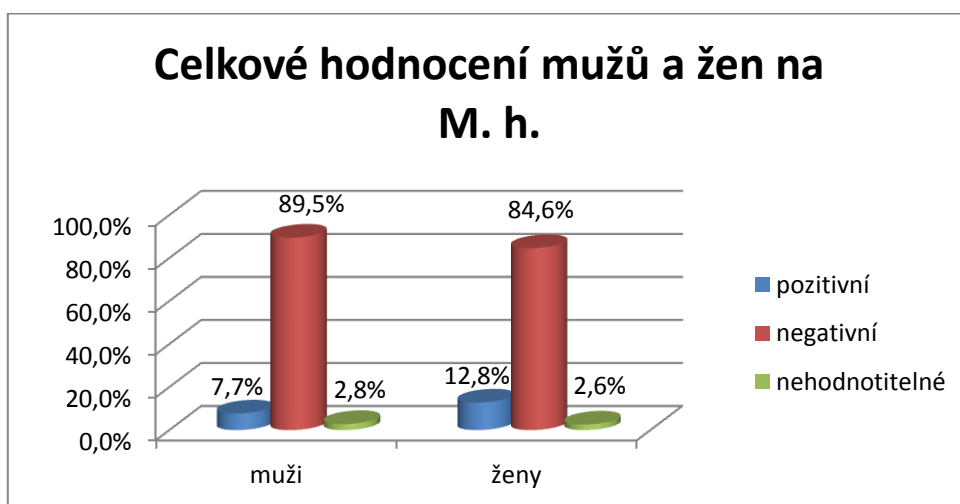
Práce byla zaměřena na diagnostiku urogenitálních mykoplasmat a to na *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* a *Mycoplasma genitalium*. V období od 1.7. – 31.12. 2014 se podařilo shromáždit celkem 221 vzorků na vyšetření *Ureaplasma urealyticum*. 143 vzorků pocházelo od mužů, z toho 18 (12,7%) vzorků bylo pozitivních, 121 (84,6%) negativních a zbylé 4 (2,7%) vzorky nelze hodnotit (= vzorek byl zkontaminovaný nespecifickou flórou). Od žen pocházelo celkem 78 vzorků. 34 (43,6%) vzorků bylo pozitivních, 42 (53,8%) negativních a 2 (2,6%) nelze hodnotit (= vzorek byl zkontaminovaný nespecifickou flórou).

(Graf č. 1: Celkové hodnocení mužů a žen na *Ureaplasma urealyticum*)

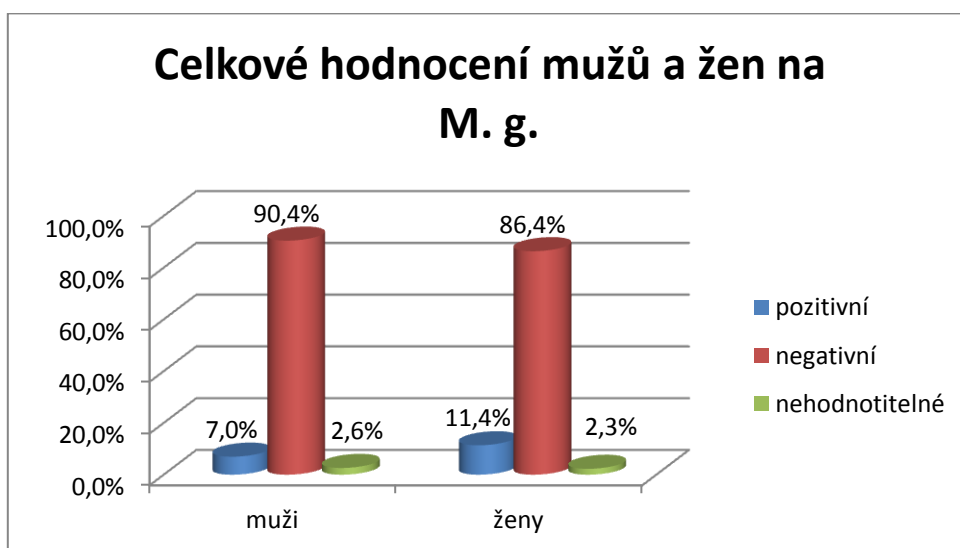


Na vyšetření *Mycoplasma hominis* se shromáždilo celkem 221 vzorků. Od mužů pocházelo 143 vzorků, z toho 11 (7,7%) vzorků bylo pozitivních, 128 (89,5%) negativních a 4 (2,8%) nebylo možné hodnotit (= vzorek byl zkontaminovaný nespecifickou flórou). 78 vzorků bylo od žen, z toho 10 (12,8%) bylo pozitivních, 66 (84,6%) negativních a zbylé 2 (2,6%) nelze hodnotit (= vzorek byl zkontaminovaný nespecifickou flórou).

(Graf č. 2: Celkové hodnocení mužů a žen na *Mycoplasma hominis*)



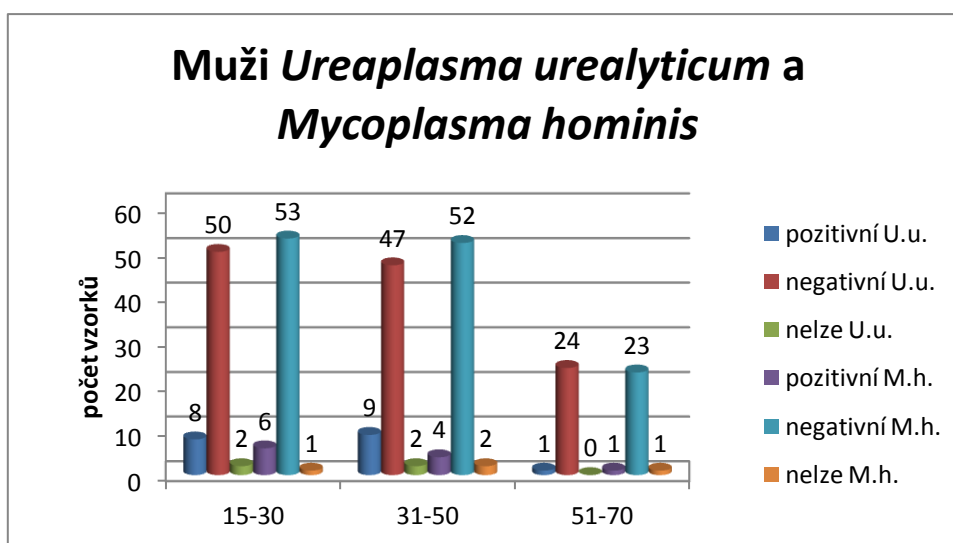
(Graf č. 3: Celkové hodnocení mužů a žen na *Mycoplasma hominis*)



Poznámka: Na grafu č. 3 je znázorněna diagnostika na *Mycoplasma genitalium*. Od mužů bylo celkem 115 vzorků, z toho 8 (7%) bylo pozitivní, 104 (90,4%) negativní a 3 nelze hodnotit (= vzorek obsahoval inhibitory a reakce nemohla správně proběhnout). Od žen pocházelo 44 vzorků, z toho 5 (11,4%) pozitivní, 38 (86,4%) negativní a 1 (2,3%) nelze hodnotit (= vzorek obsahoval inhibitory a reakce nemohla správně proběhnout).

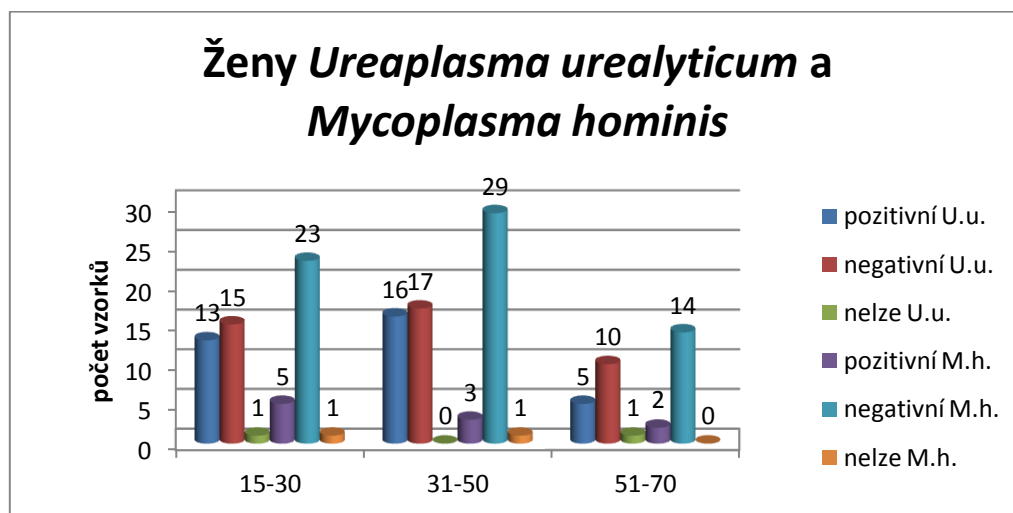
Dále byly výsledky zhodnoceny dle věku a pohlaví. Vzorky byly rozděleny do třech kategorií podle věku. Celkem bylo 143 výsledků mužů na *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis*. Na *Ureaplasma urealyticum* bylo v kategorii 15-30 let bylo celkem 60 vzorků, z toho byly 8 pozitivní (13,3%), 50 negativní (83,3%) a 2 nelze hodnotit (3,4%). Ve věku 31-50 let bylo 58 vzorků, 9 pozitivní (15,5%), 47 negativní (81%) a 2 nelze hodnotit (3,4%). Ve věku 51-70 let bylo hodnoceno 25 vzorků, 1 pozitivní (4%) a 24 negativní (96%). Na *Mycoplasma hominis* bylo též 143 vzorků mužů. V kategorii 15-30 let bylo 60 vzorků, 6 pozitivní (10%), 53 negativní (88,3%) a 1 nelze hodnotit (1,7%). Ve věku 31-50 bylo 58 vzorků, 4 pozitivní (6,9%), 52 negativní (89,7%), 2 nelze hodnotit (3,4%). V poslední kategorii 51-70 let bylo 25 výsledků, 1 pozitivní (4%), 23 negativní (92%), 1 nelze hodnotit (4%).

(Graf č. 4: Muži *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis*)



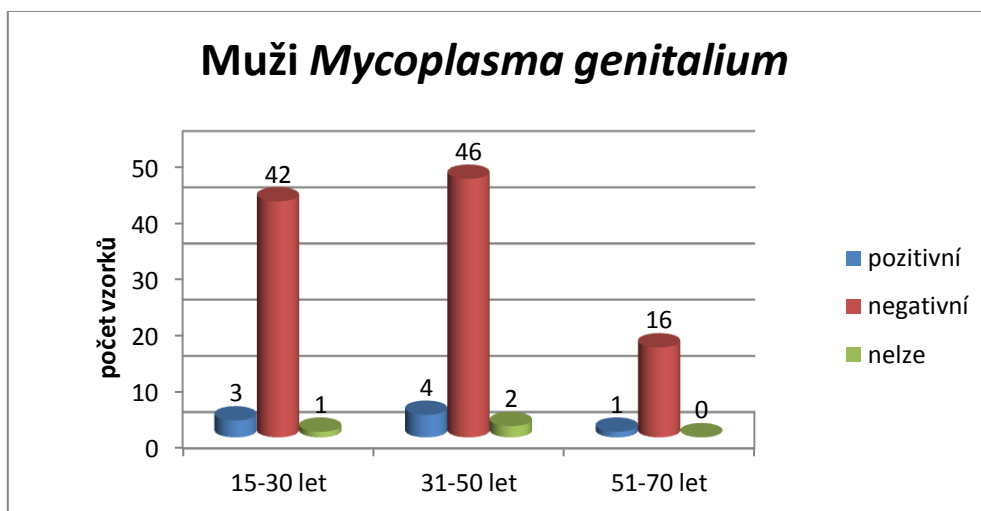
U žen bylo shromážděno celkem 78 vzorků na diagnostiku *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis*. Na *Ureaplasma urealyticum* bylo vyšetřeno 29 vzorků od pacientek ve věku 15-30, 13 pozitivní (44,8%), 15 negativní (51,7%), 1 nelze hodnotit (3,5%). V kategorii 31-50 bylo 33 výsledků, 16 pozitivní (48,5%) a 17 negativní (51,5%). Ve věku 51-70 bylo 16 vzorků, 5 pozitivní (31,3%), 10 negativní (62,5%) a 1 nelze hodnotit (6,2%). Na *Mycoplasma hominis* bylo vyhodnoceno také 78 vzorků žen. V kategorii 15-30 bylo 29 vzorků, 5 pozitivní (17,2%), 23 negativní (79,3%) a 1 nelze hodnotit (3,4%). Ve věku 31-50 bylo 33 výsledků, 3 pozitivní (9,1%), 29 negativní (87,9%), 1 nelze hodnotit (3%). Poslední kategorie měla 16 vzorků, 2 pozitivní (12,5%) a 14 negativní (87,5%).

(Graf č. 5: Ženy *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis*)

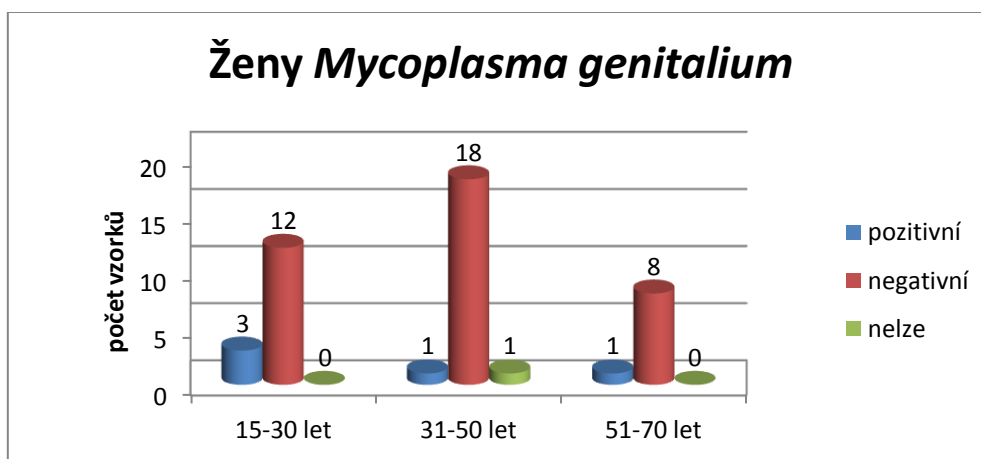


V grafu č. 6 je hodnocení mužů na *Mycoplasma genitalium* dle věkových kategorií. Celkem bylo hodnoceno 115 vzorků, v kategorii 15-30 let bylo celkem 46 vzorků, 3 pozitivní (6,5%), 42 negativní (91,3%) a 1 nelze hodnotit (2,2%). Ve věku 31-50 let bylo 52 vzorků, 4 pozitivní, 46 negativní, 2 nelze hodnotit (= vzorek obsahoval inhibitory a reakce nemohla správně proběhnout). V poslední kategorii bylo 17 vzorků, 1 pozitivní (5,9%) a 16 negativní (94,1%).

(Graf. č. 6: Hodnocení mužů *Mycoplasma genitalium*)



(Graf. č. 7: Hodnocení žen *Mycoplasma genitalium*)

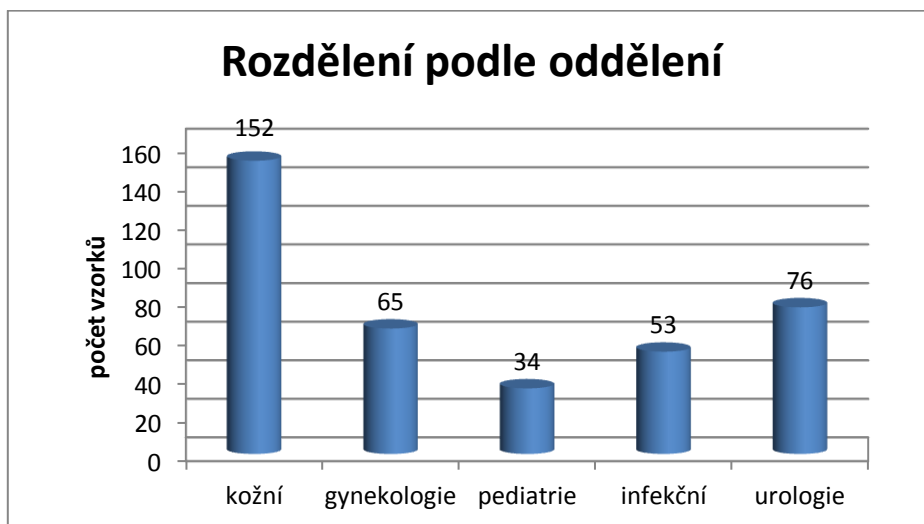


Poznámka: Celkem bylo 44 vzorků žen na vyšetření *Mycoplasma genitalium*. V kategorii 15-30 let bylo 15 výsledků, 3 pozitivní (20%) a 12 negativní (80%). Ve věku 31-50 let bylo 20 vyšetření, 1 pozitivní (5%), 18 negativní (90%), 1 nelze hodnotit (5%). V poslední kategorii 51-70 let bylo 9 vyšetření, 1 pozitivní (11,1%) a 8 negativní (88,9%).

V grafu č. 7 je znázorněno z jakých oddělení bylo o daná vyšetření zažádáno. Celkový počet vzorků k vyšetření bylo 380. Z kožního oddělení bylo zasláno 152

vzorků (40%), z gynekologie 65 vzorků (17,2%), z pediatrie 34 vzorků (8,9%), z infekčního oddělení 53 vzorků (13,9%) a z urologie 76 vzorků (20%).

(Graf č. 7: Rozdělení materiálu dle oddělení)



5. Diskuse

Mycoplasma genitalium, *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* jsou bakterie, které jsou běžnou součástí mikroflóry u zdravého člověka.⁽³¹⁾ Pokud však dojde k přemnožení, mohou způsobovat různá urogenitální onemocnění, jako například uretritidy, pyelonefritidy, vaginózy, komplikace v těhotenství, možný je i potrat.

Dle doporučení WHO, pokud dojde k průkazu mykoplasmat, ale pacient nemá žádné klinické příznaky, lékař není oprávněn zahájit léčbu urogenitální infekce.⁽²⁵⁾

Mycoplasmata se přenáší přímým kontaktem mezi hostiteli, nejčastěji pohlavním stykem, možný je i přenos vertikální z matky na dítě intrauterinně či při porodu. Ve většině případů infekce vymizí. Pouze u malého počtu případů kolonizace přetrvává. Asi 15 % případů novorozenců je kolonizováno *M. hominis* a 45-75 % *U. urealyticum*. Nosiči infekce bývají asymptomatictí, ale organismy mohou být oportunními patogeny, uvádí Křemenová.⁽¹⁵⁾

Tyto bakterie kolonizují urogenitální trakt sexuálně žijících jedinců, u žen nacházíme *Mycoplasma hominis* ve 21-53 %, *Ureaplasma urealyticum* ve 40-80 %, u mužů je přítomnost bakterií podobná, avšak nižší jak uvádí Vaňousová.⁽³³⁾

Ve výzkumné části mé bakalářské práce bylo shromážděno 221 vzorků na vyšetření *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis*. 143 vzorků (64,7%) pocházelo od mužů a 78 vzorků (35,3%) bylo od žen. Na *Ureaplasma urealyticum* bylo pozitivních 18 vzorků od mužů (12,7%) a 34 vzorků (43,6%) od žen. Ženy mají častěji subklinický průběh infekce, proto se domnívám, že byl nižší počet odebraných vzorků od žen. Na *Mycoplasma hominis* vyšlo 11 vzorků (7,7%) od mužů a 10 vzorků (12,8%) od žen pozitivních, jak je vše zobrazeno v grafu č. 4 a 5.

Z celkového počtu bylo 6 vzorků nezhodnotitelných kultivační metodou MycoView. Převážně se jednalo o kontaminaci bakteriemi nebo kvasinkami.

Výzkum tedy potvrdil, že skutečně *Ureaplasma urealyticum* i *Mycoplasma hominis* více postihuje ženy, jak píše ve své práci Vaňousová. Na *Ureaplasma urealyticum* bylo pozitivní nižší procento mužů. *Mycoplasma hominis* bylo u obou pohlaví podobné procento postižených. Výsledky se shodují i s publikací od Kacerovského⁽¹³⁾, a to že u mužů je výskyt *M. hominis* izolováno v 0 – 13% případů a *Ureaplasma urealyticum* v 5 – 56% vyšetřovaných.

Samozřejmě je nutné přihlédnout k faktu, že výsledky nemohou být zcela porovnatelné a to proto, že v mé práci nebyly vyšetřovány i klinicky zcela zdravé osoby stejně jako to bylo třeba u Kacerovského.

Dále byl prováděn výzkum na *Mycoplasma genitalium*. Dohromady bylo 159 vzorků. 115 vzorků (72,3%) pocházelo od mužů, z toho bylo 8 vzorků (7%) pozitivní a 44 vzorků (27,7%) od žen, z toho bylo 5 vzorků (11,4%) pozitivní. Jak je uvedeno v tabulce č. 5., 6. Z toho vyplývá, že i *Mycoplasma genitalium* se častěji vyskytuje u žen. Tento výsledek je v rozporu s literaturou, ve které se uvádí, že se *Mycoplasma genitalium* častěji vyskytuje u mužů a to až u 25% vyšetřovaných, kdežto u žen byl pozitivní výsledek pouze u 4 – 9%.⁽¹⁹⁾

Z celkového počtu vyšetřených vzorků na *Mycoplasma genitalium* byly 4 nezhodnotitelné. Nejpravděpodobnějším důvodem byla přítomnost inhibitorů, Taq polymerázy, které nebyly odstraněny předchozím extrakčním izolačním procesem.

Tento rozdíl přisuzuji nedostatečnému počtu vzorků. Vzhledem k tomu, že vyšetření na *Mycoplasma genitalium* je poměrně nová metoda, řada kliniků tuto možnost opomíná a požadavek k vyšetření zasílá až při přetrvávajících obtížích a po vyloučení ostatních urogenitálních patogenů jako je *Chlamydia trachomatis* či *Neisseria gonorrhoeae*.

Povědomí o problému urogenitálních mykoplasmat pravděpodobně není dostatečné. Procenta pozitivních pacientů, převážně žen je téměř srovnatelné ve věkové skupině 15 – 30 let a 31 – 50 let. Ve věkové skupině 15 – 30 let lze tyto výsledky možná přisuzovat začátku sexuální aktivity a častému střídání sexuálních partnerů. Nejnižší věk pacientky bylo 15 let. Ve věkové skupině 31 – 50 bych jako problém viděla již chronické či recidivující infekce. Důvodem může být, že pacientky na urogenitální infekce nikdy nebyly vyšetřeny a správně léčeny.

Materiál, který byl vyšetřován, pocházel od pacientů, u kterých se projevovaly klinické příznaky, dlouhodobé a recidivující potíže. Vzorky byly zaslány z různých pracovišť, nejčastěji však z kožního oddělení. Celkově bylo získáno 380 vzorků, z toho 152 vzorků (40%) bylo z kožního oddělení, 65 vzorků (17,2%) z gynekologie, z pediatrie 34 vzorků (8,9%), z infekčního oddělení 53 vzorků (13,9%) a z urologie 76 vzorků (20%). Jak je uvedeno v grafu č. 6.

Dle mého názoru jsou urogenitální mykoplasmata často opomíjeným klinickým problémem.

6. Závěr

V bakalářské práci bylo zhodnoceno 221 vzorků na vyšetření *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*, z toho bylo 143 od mužů a 78 od žen. Vyšetření byla prováděna pomocí kultivačních setů Mycoview®.

K detekci *Mycoplasma genitalium* bylo k dispozici 159 vzorků. 115 od mužů a 44 od žen. K detekci byly použity diagnostické sety *Mycoplasma genitalium* Real – Time PCR.

Tyto testy jsou velice citlivé a pro diagnostiku dostačující. Záchyt patogenu *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* odpovídá předpokládaným výsledkům a to, že vyšší výskyt urogenitálních infekcí je u žen. Z mých výsledků je patrné, že výskyt pozitivních výsledků u žen ve věku 15 – 30 let a 31 – 50 let je téměř srovnatelný (viz diskuze).

Mycoplasma genitalium bylo také častěji detekováno u žen, což je v rozporu s dosud známými studiemi, které udávají, že častější výskyt *Mycoplasma genitalium* je u mužů. Tuto neshodu přisuzuji nedostatku vzorků k vyšetření.

Během vypracovávání své bakalářské práce jsem se naučila technicky zvládnout výše uvedené metody, včetně izolace DNA. Zároveň jsem se naučila základně odečítat výsledky. Veškeré práce jsem prováděla pod dozorem, vzhledem k tomu, že nejsem zdravotnický pracovník.

Má bakalářská práce poskytuje informace o urogenitálních infekcích, diagnostice, léčbě a případných komplikacích. Práce tedy může sloužit jako zdroj informací pro zdravotnické pracovníky, studenty zdravotnických oborů, případně pro zájemce o tuto problematiku.

7. Klíčová slova

Diagnostika

Mykoplasmata

Mycoplasma hominis

Mycoplasma genitalium

Ureaplasma urealyticum

PCR

8. Citace

1. BACZYNSKA, A., FUNCH, P., FEDDER, J., KNUDSEN, H. J., BIRKELUND,S., CHRISTIANSEN, G. Morphology of human fallopian tubes after infection with *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* – in vitro organ culture study.*Human Reproduction*, 2007, vol. 22, no. 4, s. 968-979.
2. BARTONÍČKOVÁ, K. *Uroinfekce*. 1. vyd. Praha: Galén, 2000, 79 s. Folia practica. ISBN 80-7262-027-4
3. BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011, 164 s. ISBN 978-80-247-3533-7
4. BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha : Marvil, 1996, 558 s. ISBN 80-2380-297-6
5. CARLSEN, K.,H., JENSEN, S.,J. *Mycoplasma genitalium PCR: Does Freezing of Specimens Affect Sensitivity?* *Journal of clinical microbiology*, 2010, vol. 48, no. 10, s. 3624–3627
6. CIMOLAI, N. *Laboratory diagnosis of bacterial infections*. New York: Marcel Dekker, 2001. 936 s. ISBN 0-8247-0589-0.
7. Diagnostické protokoly - CFX Connect™ Real – Time PCR Detection Systém. Bio - RAD. 2009
8. DOMINGUES,D.; TAVORA TAVIRA, L.; DUARTE, A.; et al. *Acta Tropica*, 2003, vol. 86, s. 19–24, ISSN: 0001–706X.

9. DVOŘÁKOVÁ, K. Nejčastější sexuálně přenosné infekce a možnosti jejich léčby. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2009, roč. 23, č.1, s.24-29, ISSN 1212-7973
10. GREENWOOD, D., SLACK, R.C.B., PEUTHERER, J.F. *Lékařská mikrobiologie: Přehled infekčních onemocnění: patogenéze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s, 1999, 686s. ISBN 80-7169-365-0.
11. HAGGERTY, C.,L., TAYLOR, B., D. *Mycoplasma genitalium: An Emerging Cause of Pelvic Inflammatory Disease* *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2011, ID 959816
12. HARTMANN, M. – *Genitale Mykoplasmen-Infektionen*. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 2009, vol. 7, s. 371–378, ISSN: 1610–0387.[online].[cit.2012-04-28]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com>
13. KACEROVSKY, M., BOUDYŠ, L. *Česká gynekologie*. Praha Předčasný odtok plodové vody a *Ureaplasma urealyticum*, 2008 roč. 73, č. 3
14. KEANE, F.E.A., THOMAS, B.J., GILROY, C.B., RENTON, A., TAYLOR, ROBINSON,D. The association of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* with bacterial vaginosis:observation on heterosexuál women and their male partners. *International Journal of STD and AIDS*, 2000, vol. 11, s. 356 – 360
15. KŘEMENOVÁ, S., KŘEMEN, J. *Mykoplazmové infekce – bakteriální záhada*. *Postgraduální medicína*. 2007. [online]. [cit. 2015 -04-07]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina>

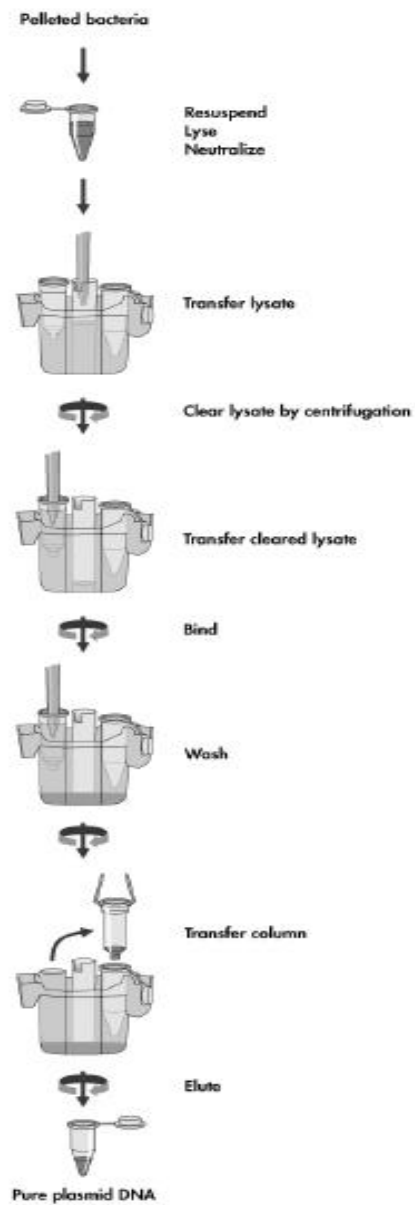
16. KOLOMBO, I., PORŠ, J., PORŠOVÁ, M. Intracelulární patogeny v urologii. *Urologie pro praxi*, 2007, roč. 8, č. 5, s. 205-210. ISSN 1213-1768
17. KOLOMBO, I., BERNDT, D., PABIŠTA, R. Problémy současných STD v naší urologické praxi. *Urologie pro praxi*, 2004, roč. 5, č. 3, s. 129-130. ISSN 1213-1768
18. MACEK, P. *Infekce močových cest – a co muži?* *Urologie pro praxi*, 2011, roč. 12, č. 3, s. 164-167. ISSN 1213-1768
19. MANHART, L., BROAD, J., GOLDEN, M., *Mycoplasma genitalium: Should We Treat and How?* *Clinical Infectious Diseases*, 2011, vol. 53, 129 - 142s.
20. MAŠATA, J., JEDLIČKOVÁ, A., ŠVIHOVEC, P. Antibiotická léčba a profylaxe některých infekcí v těhotenství. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2008, roč. 22, č. 4, s. 137 – 141. ISSN - 1212-7973
21. MEDKOVÁ, Z., KALOUSEK, I., JARČUŠKA, P. *Chlamydiové infekce* Praha: TRITON, 2001
22. Diagnostické protokoly - MYCOPLASMA GENITALIUM Real – Time PCR User Manual. Diagenode. 2014
23. MURRAY, P.R., *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. Washington: ASM Press, 1995, 1482 s. ISBN 1555810861.
24. Diagnostické protokoly - Mycoview®. Zeakon diagnostics. 2014
25. PÁRALOVÁ, L. Pohlavní choroby II. díl. *Dermatologie pro praxi*, 2008, roč. 2, č. 3, s. 140 – 143. ISSN - 1802-2960

26. QIAcube User Manual. QIAGEN. 2008
27. RAZIN, S. *Mycoplasmas*. [online]. Dostupné z: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch037.htm>. [cit. 2003-03-19]
28. RAZIN, S., YOGEV, D., NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, vol. 62, no. 4, s.1094-1156
29. TAKASHI, D.,SCHIN-ICHI,M. *Mycoplasma genitalium*: Another important pathogen of nongonococcal. *Urol*, 2002, 167 s. ISSN 1210 – 1217
30. TULLY, J. G. Mollicute-Host Interrelationships: Current concepts and diagnostic implications. In: TULLY, J. G. – RAZIN, S. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. Vol. II Diagnostic procedures*. San Diego: Academic press, 1996. 462s. ISBN 0-12-583806-9
31. VOTAVA, M. et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2003. 495s. ISBN 80-902896-6-5
32. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, 309 s. ISBN 80-210-2272-8
33. VAŇOUSOVÁ, D., BERNARDOVÁ, J., SÝKOROVÁ, B. *Uretrtidy z pohledu dermatovenerologa*. Postgraduální medicína. 2010. [online]. [cit. 2015 -04-07]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina>

9. Přílohy

Příloha č. 1: Stručný popis přípravy vzorku pomocí QIAcube ⁽²⁶⁾

QIAprep Miniprep Standard Procedure



Příloha č. 2: Obsah soupravy Mycoview®⁽²⁴⁾



Příloha č. 3: Strip soupravy Mycoview®⁽²⁴⁾

