

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Špela ŽULA

**UVEDBA IN OVREDNOTENJE DIAGNOSTIČNE METODE ZA
DOLOČITEV BAKTERIJE *Mycoplasma genitalium***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INTRODUCTION AND EVALUATION OF DIAGNOSTIC METHOD
FOR DETECTION OF *Mycoplasma genitalium***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, v Laboratoriju za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami.

Po sklepu študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije, z dne 16.6.2008 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu, je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Eva Ružić – Sabljic, za somentorico doc. dr. Darja Keše in za recenzentko prof. dr. Manica Mueller – Premru.

Mentorica: prof. dr. Eva Ružić – Sabljic

Somentorica: doc. dr. Darja Keše

Recenzentka: prof. dr. Manica Mueller - Premru

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Eva RUŽIĆ - SABLJIĆ

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: doc. dr. Darja KEŠE

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Manica MUELLER – PREMUR

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Špela Žula

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.63: 616.6-002 (043)=163.6
KG urogenitalne bolezni/ *Mycoplasma genitalium*/uretritis/diagnostične metode/brisi sečnice/ brisi materničnega vratu/molekularne tehnike/PCR
AV ŽULA, Špela
SA RUŽIČ – SABLJIČ, Eva (mentorica)/KEŠE, Darja (somentorica)/MUELLER – PREMUR, Manica (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2008
IN UVEDBA IN OVREDNOTENJE DIAGNOSTIČNE METODE ZA DOLOČITEV BAKTERIJE *Mycoplasma genitalium*
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 73 str., 6 pregl., 19 sl., 101 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen naloge je bil uvedba in ovrednotenje metode verižne reakcije s polimerazo - PCR (polymerase chain reaction) v diagnostiko okužb z bakterijo *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*), ki povzroča urogenitalne bolezni pri ljudeh in se prenaša s spolnimi stiki. Iz Dermatovenerološke in Infekcijske klinike v Ljubljani, smo jeseni leta 2006 pridobili 88 urogenitalnih vzorcev pacientov in pacientk z uretritisom. Brise sečnice in materničnega vratu smo do testiranja hranili v gojišču za urogenitalne bakterije, ter v transportnem gojišču za klamidije, pri -70 °C. DNK *M. genitalium* smo izolirali in pomnoževali s kompleti reagentov različnih proizvajalcev. Izolacijo DNK iz vzorcev smo po navodilih proizvajalcev izvedli s kompletoma reagentov DNA-Sorb-A (Sacace Biotechnologies Srl, Italija), in QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Nemčija). Pomnoževanje odseka znotraj izolirane DNK smo izvedli s kompletom reagentov *Mycoplasma genitalium* 280/550 IC (Sacace Biotechnologies Srl, Italija), s katerim smo dobili pomnožen fragment DNK velikosti 280 bp, ter *Mycoplasma genitalium* (Genekam Biotechnology AG, Nemčija), s katerim smo dobili pomnožen pridelek DNK velikosti 507 bp. Pomnožene fragmente DNK smo dokazovali z elektroforezo v agaroznem gelu. Izmed 88 urogenitalnih vzorcev, smo DNK *M. genitalium* potrdili pri 2 vzorcih. Vzorca sta bila brisa sečnice bolnikov z uretritisom. Vzorce so kasneje v Laboratoriju za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami testirali tudi z metodo LightCycler PCR, s katero so potrdili naša pozitivna vzorca. Ugotovili smo, da je molekularna metoda PCR primerna in hitra metoda za dokazovanje okužb z *M. genitalium*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.63: 616.6-002 (043)=163.6
CX urogenital infections/ *Mycoplasma genitalium*/urethritis/diagnostic methods/urethral swabs/ cervical swabs/molecular techniques/PCR
AU ŽULA, Špela
AA RUŽIČ – SABLJIČ, Eva (supervisor)/KEŠE, Darja (co-advisor)/MUELLER – PREMUR, Manica (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2008
TI INTRODUCTION AND EVALUATION OF DIAGNOSTIC METHOD FOR DETECTION OF *Mycoplasma genitalium*
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 73 p., 6 tab., 19 fig., 101 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of the study was to introduce and validate molecular method polymerase chain reaction (PCR) for diagnosis of urogenital infection with sexually transmitted bacterium *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*). In autumn 2006 we acquired 88 urogenital samples of patients with urethritis from Dermatology clinic and from Clinic for infectious diseases in Ljubljana. Urethral and cervical swabs were placed into medium for urogenital bacterium and into chlamydia transport medium and frozen at – 70 °C. DNA was extracted and amplified from samples with reagents of various manufacturers. DNA was extracted by using DNA-Sorb-A (Sacace Biotechnologies Srl, Italija) and QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany), following the manufacturer' s protocols. Amplification of DNA was performed by using comercial kits *Mycoplasma genitalium* 280/550 IC (Sacace Biotechnologies Sr, Italy) and *Mycoplasma genitalium* (Genekam Biotechnology AG, Germany). Amplified products of 280 bp (Sacace Biotechnologies Srl, Italy) and 507 bp (Genekam Biotechnology AG, Germany) were visualized by agarose gel electrophoresis. DNA of *M. genitalium* was confirmed in 2 of 88 examined samples by using PCR. The samples were later retested also by LightCycler PCR in the same laboratory that confirmed our positive samples. We concluded that molecular method PCR is appropriate, sensitive and fast to detect infections with *M. genitalium*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BIOLOŠKE LASTNOSTI MIKOPLAZEM	3
2.2 <i>Mycoplasma genitalium</i>	7
2.3 TAKSONOMSKA RAZVRSTITEV MIKOPLAZEM	12
2.4 GENOM <i>M. genitalium</i>	14
2.5 EPIDEMIOLOGIJA OKUŽB Z BAKTERIJO <i>M. genitalium</i>	17
2.6 PRENOS OKUŽBE Z <i>M. genitalium</i>	22
2.7 BOLEZNI, KI JIH POVZROČA <i>M. genitalium</i>	23
2.8 PATOGENEZA OKUŽB Z BAKTERIJO <i>M. genitalium</i>	26
2.9 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA	29
2.9.1 Osamitev bakterije <i>M. genitalium</i> iz kužnine	30
2.9.2 Metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR)	31
2.9.3 Metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času	33
2.9.3.1 Več tarčni PCR v realnem času	34
3 MATERIAL IN METODE	35
3.1 ZBIRANJE IN SHRANJEVANJE KUŽNINE	35
3.2 OSAMITEV BAKTERIJSKE DNK	36
3.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	40
4 REZULTATI	46
4.1 DOKAZOVANJE DNK <i>M. genitalium</i> Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO ...	46
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	50
5.1 RAZPRAVA	50

5.2	SKLEPI.....	58
6	POVZETEK.....	59
7	VIRI	61

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Poznani sevi <i>Mycoplasma genitalium</i> in mesto izolacije (Jensen, 2006).....	7
Preglednica 2: Prevalenca okužb z <i>Mycoplasma genitalium</i> pri moških z akutnim ne-gonokoknim uretritisom, akutnim ne-klamidijskim ne-gonokoknim uretritisom, ter pri asimptomatskih moških (Ishihara in sod., 2004).....	19
Preglednica 3: Preglednica vzorcev.....	35
Preglednica 4: Rezultati dokazovanja okužb z <i>Mycoplasma genitalium</i> z metodo PCR in z metodo PCR v realnem času.....	46
Preglednica 5: Izolacija DNA z kompletom reagentov DNA Sorb-A (Sacace Biotechnologies Srl, Italija) in QIAamp®DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Nemčija) iz gojišča za urogenitalne mikoplazme (UMMT) in iz transportnega gojišča (2SP).	49
Preglednica 6: V preglednici so podani rezultati testiranja brisov sečnice in materničnega vratu za dokaz bakterije <i>Mycoplasma genitalium</i> z metodo polimerazne verižne reakcije (PCR).	49

KAZALO SLIK

Slika 1: Celice mikoplazem so obdane s plazmatsko membrano. V citoplazmi so vidne tanke nitke odsekov kromosoma in temnejša zrnca, ki predstavljajo ribosome (Razin, 1996).....	3
Slika 2: Morfologija kolonij mikoplazem na agarju (Razin, 1996).....	4
Slika 3: Shematski prikaz obeh načinov razmnoževanja pri mikoplazmah (Razin, 1996). ..	6
Slika 4: Slika prikazuje pritrditev bakterije <i>Mycoplasma genitalium</i> na celice Vero. (Jensen, 2006).....	8
Slika 5: Elektronska mikroskopija vezave bakterije <i>Mycoplasma genitalium</i> na celice jajcevoda pri ženskah (Jensen, 2006).	9
Slika 6: Dve Vero celici, pri katerih je vidno tako pritrdjanje mikoplazem na celično membrano, kot tudi znotrajcelčna lokacija bakterije <i>Mycoplasma genitalium</i> (Jensen, 1994).....	10
Slika 7: Filogenetsko drevo na podlagi genskih sekvenc 16S rRNA (Jensen, 2006).....	13
Slika 8: Nomenklatura operona MgPa (Jensen, 2006).	15
Slika 9: Število kopij genoma <i>Mycoplasma genitalium</i> pri asimptomatskih preiskovancih, ter pri pacientih z uretritisom (Jensen in sod., 2004b).	18
Slika 10: Prevalenca okužb z bakterijama <i>Mycoplasma genitalium</i> in <i>Chlamydia trachomatis</i> pri moških, ki so med avgustom 1997 in novembrom 2001 obiskali kliniko za spolno prenosljive bolezni na Švedskem. (Jensen in sod., 2004c).	21
Slika 11: Prevalenca okužb z bakterijama <i>Mycoplasma genitalium</i> in <i>Chlamydia trachomatis</i> pri ženskah, ki med avgustom 1997 in novembrom 2001 obiskale kliniko za spolno prenosljive bolezni na Švedskem (Jensen in sod., 2004c).	21
Slika 12: Mehanizem oksidativnih poškodb mikoplazem na gostiteljske celice (Razin, 1996).....	27
Slika 13: Shematski prikaz polimerazne verižne reakcije (George, 2008).....	32
Slika 14: Kvantitativni PCR v realnem času (Grove, 1999).....	33
Slika 15: Reakcijska mešanica za reakcijo PCR.	42
Slika 16: Priprava PCR pridelkov in nanašalnega pufra za gelsko elektroforezo	44

Slika 17: Gelska elektroforeza pridelkov verižne reakcije s polimerazo (PCR) <i>Mycoplasma genitalium</i> s kompletom reagentov Mycoplasma genitalium 280/550 IC (Sacace Biotechnologies Srl, Italija).....	47
Slika 18: Gelska elektroforeza pridelkov verižne reakcije s polimerazo (PCR) <i>Mycoplasma genitalium</i> s kompletom reagentov nemškega proizvajalca Mycoplasma genitalium (Genekam Biotechnology AG, Nemčija)	48
Slika 19: Rezultati metode PCR v realnem času za določitev okužbe z bakterijo <i>Mycoplasma genitalium</i>	48

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	(angl. amplified fragment length polymorphism)
AIDS	(angl. acquired immune deficiency syndrome)
AK	amino kislina
BAL	bronhoalveolarni izpirek (angl. bronchoalveolar lavage)
Beljakovina MgPa	glavna adhezijska beljakovina bakterije <i>M. genitalium</i>
Beljakovina MG075	membransko vezana površinska beljakovina bakterije <i>M. genitalium</i>
Beljakovina P1	glavna adhezijska beljakovina bakterije <i>M. pneumoniae</i>
Beljakovina P32	adhezijska beljakovina bakterije <i>M. genitalium</i>
bp	bazni par
C	citozin
<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
<i>dnaA</i>	faktor začetka podvojevanja
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotidtrifosfati (angl. deoxyribonucleotide triphosphate)
Eco R1	restriksijski encim
G	gvanin
G-37	tipski sev bakterije <i>M. genitalium</i>
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
IC	interna kontrola (angl. internal control)
<i>In vitro</i>	v laboratorijskih pogojih
<i>In vivo</i>	v naravnem okolju
Kodon UGA	kodon, ki običajno kodira STOP signal
LC PCR	LightCycler PCR
LPS	lipopolisaharid
<i>M. alvi</i>	<i>Mycoplasma alvi</i>
<i>M. amphoriforme</i>	<i>Mycoplasma amphoriforme</i>
<i>M. capriolum</i>	<i>Mycoplasma capriolum</i>
<i>M. gallisepticum</i>	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>

<i>M. genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>M. hominis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
<i>M. imitans</i>	<i>Mycoplasma imitans</i>
<i>M. pirum</i>	<i>Mycoplasma pirum</i>
<i>M. pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>M. testudinis</i>	<i>Mycoplasma testudinis</i>
M-30	sev bakterije <i>M. genitalium</i>
M2282	sev bakterije <i>M. genitalium</i>
M2288	sev bakterije <i>M. genitalium</i>
M2300	sev bakterije <i>M. genitalium</i>
M2321	sev bakterije <i>M. genitalium</i>
M2341	sev bakterije <i>M. genitalium</i>
M6090	sev bakterije <i>M. genitalium</i>
M6151	sev bakterije <i>M. genitalium</i>
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
O ² -	superoksidni radikal
ORF	odprt bralni okvir (angl. open reading frame)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PMNL	polimorfonuklearni levkociti (angl. polymorphonuclear leucocytes)
R 32G	sev bakterije <i>M. genitalium</i>
RNK	ribonukleinska kislina
rRNK	ribosomska ribonukleinska kislina
Tw 10-5G	sev bakterije <i>M. genitalium</i>
Tw 10-6G	sev bakterije <i>M. genitalium</i>
Tw 48-5G	sev bakterije <i>M. genitalium</i>
<i>U. parvum</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
<i>U. urealyticum</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
UTMB-10G	sev bakterije <i>M. genitalium</i>

1 UVOD

Mycoplasma genitalium je najmanjša prostoživeča bakterija, ki je sposobna samostojnega razmnoževanja. Njen genom obsega 580 074 bp in vsebuje le gene, pomembne za preživetje bakterije (Fraser in sod, 1995; Koonin, 2000). Glede na mesto, kjer povzroča okužbe, so bakterijo poimenovali *M. genitalium* (Tully in sod, 1983).

Rod *Mycoplasma* uvrščamo v družino *Mycoplasmataceae*, red *Mycoplasmatales*, razred *Mollicutes*, deblo *Firmicutes* ter kraljestvo Bacteria. Kljub temu, da se bakterije rodu *Mycoplasma* po Gramu ne obarvajo, saj nimajo celične stene, so filogenetsko sorodne Gram pozitivnim bakterijam z nizko vsebnostjo G+C baznih parov (Madigan in sod., 2003).

Mikoplazme so najmanjši organizmi med prokarionti, ki so sposobni samostojnega razmnoževanja. Za te bakterije je značilno nizko število celičnih beljakovin ter odsotnost številnih encimskih dejavnosti in metabolnih poti, kar se kaže v kompleksnih prehrabnih zahtevah in dobri prilagojenosti na parazitski način življenja (Fadiel in sod., 2005). Mikoplazme so sposobne vdreti v človeške tarčne celice in se znotraj njih razmnoževati daljše časovno obdobje (Baseman in sod., 1995; Dallo in sod., 2000). Bakterija *M. genitalium* povzroča okužbe urogenitalnih poti, predvsem pa jo povezujejo z ne-gonokoknim uretritisom. Prenaša se s spolnim stikom (Jensen, 2006).

Posebne biološke lastnosti *M. genitalium* (odsotnost celične stene in majhna velikost), onemogočajo uporabo tradicionalnih ter relativno preprostih metod, kot so barvanje histopatoloških preparatov in svetlobna mikroskopija pri dokazovanju te bakterije v kužnini (Blaylock in sod., 2004). Izolacija bakterije iz bolnikove kužnine je zelo zahteven in dolgotrajen postopek, gojimo jo na posebnih selektivnih in obogatenih gojiščih (Jensen in sod., 1996; Tully in sod., 1981). Čeprav sekvenčna analiza DNK *M. genitalium* kaže homologijo z *M. pneumoniae* le v 1,8 %, so številni antigeni sorodni antigenom *M. pneumoniae*, kar ovira serološko diagnostiko (Lind in sod., 1984; Svenstrup in sod., 2005).

Ker so se tradicionalne diagnostične metode, kot so izolacija bakterije in serološki testi izkazale za neuspešne pri dokazovanju *M. genitalium*, se je v preteklosti pričelo raziskovanje novih metod (Jensen in sod., 2003). Proti koncu osemdesetih let, so klinično diagnostiko bakterije izboljšale različice testov PCR (Jensen in sod., 1991). Laboratorijska diagnostika okužb z *M. genitalium* danes temelji predvsem na molekularnih testih (Baseman in sod., 2004; Jensen in sod., 2003; Svenstrup in sod., 2005).

V zadnjem desetletju identificirajo *M. genitalium* kot pogosto povzročiteljico ne-gonokoknega uretritisa tako v industrijsko razvitih državah kot tudi v državah v razvoju (Taylor-Robinson in sod., 2001; Horner in sod., 2001, Pépin in sod., 2001). Ti podatki kažejo na potrebo po nadaljnjih kliničnih študijah o bakteriji, dejavnikih tveganja za okužbo ter zdravljenju okužbe z *M. genitalium* (Dutro in sod., 2003). Glavno oviro pri širjenju znanja o *M. genitalium* predstavlja pomanjkanje komercialno dostopnih diagnostičnih testov ter splošnih referenčnih standardov za oceno teh testov (Jensen in sod., 2004c).

1.1 NAMEN NALOGE

Namen naloge je bil ugotoviti prevalenco okužb z *M. genitalium* v vzorcih bolnikov z uretritisom. Prav tako smo molekularno metodo PCR za dokaz okužbe z *M. genitalium* ovrednotili na vzorcih bolnikov z uretritisom.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

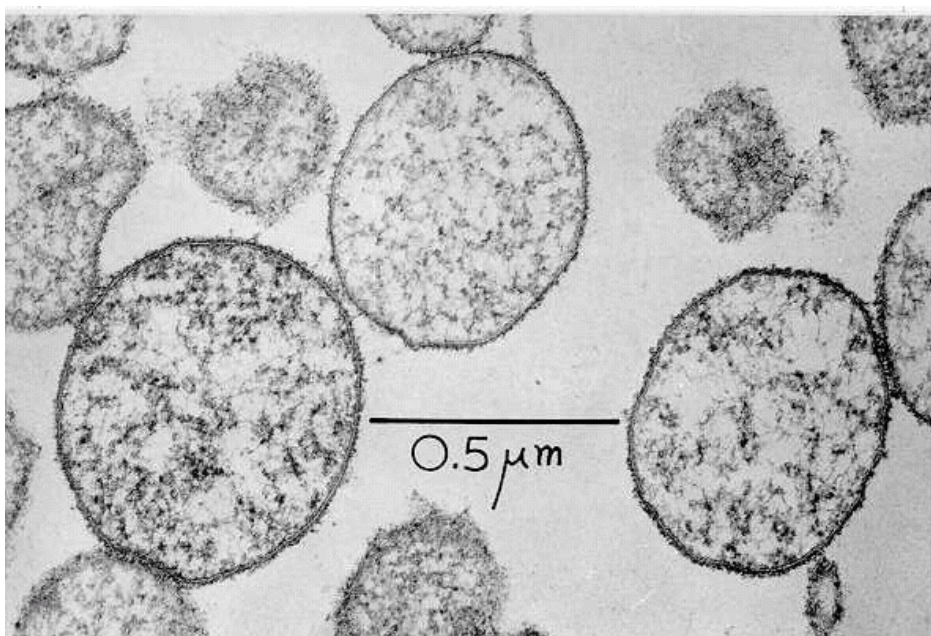
Predpostavljamo:

- da z našimi metodami lahko dokažemo DNK bakterije *Mycoplasma genitalium*
- da je vsaj 5 % bolnikov z uretritisom okuženih z bakterijo *Mycoplasma genitalium*

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOLOŠKE LASTNOSTI MIKOPLAZEM

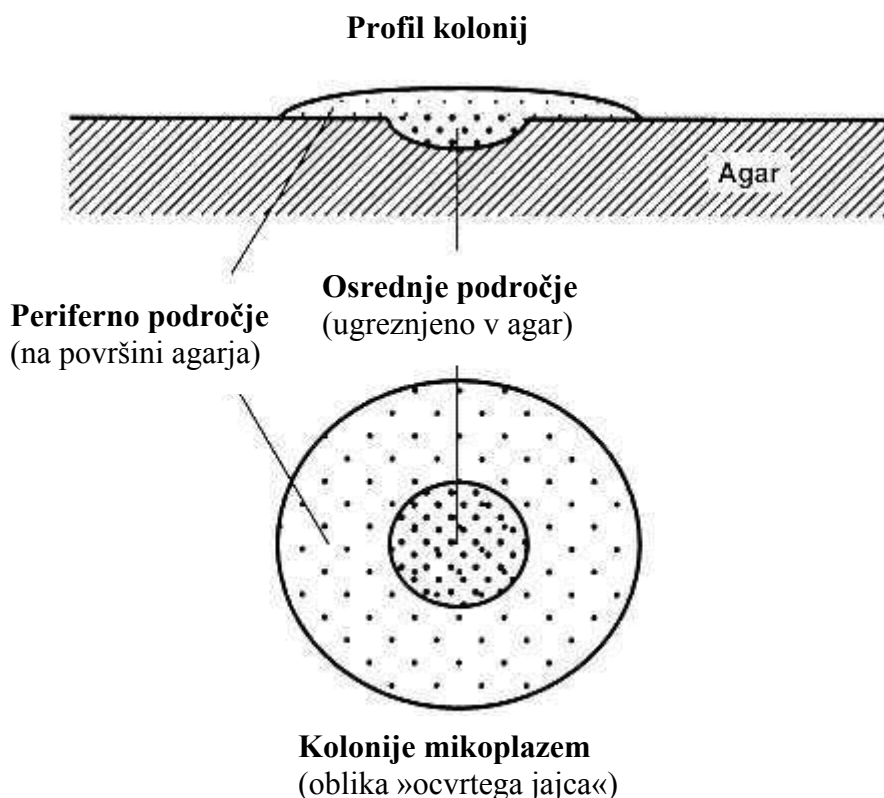
Mikoplazme so najmanjše prostoživeče bakterije (Razin, 1996), velike od 150-350 nm, kar je bližje velikosti virusov, kot pa ostalih bakterij (Hardy, 2005). Imajo majhen genom, ki obsega od 500-1000 genov, z nizko vsebnostjo gvanina in citozina. Značilnost teh bakterij je, da vsebujejo minimalno število organelov, potrebnih za rast in razmnoževanje: imajo plazmatsko membrano, ribosome ter genom iz dvoverižne krožne DNK molekule (Razin, 1996). (Celice mikoplazem prikazuje slika 1).



Slika 1: Celice mikoplazem so obdane s plazmatsko membrano. V citoplazmi so vidne tanke nitke odsekov kromosoma in temnejša zrnca, ki predstavljajo ribosome (Razin, 1996).

Mikoplazme so v obliki kokov ali pa so filamentoznih oblik. Kokoidna oblika je osnovna oblika mikoplazem v kulturi. Premer najmanjšega koka, zmožnega razmnoževanja, je okrog 300 nm. Filamentozne oblike dosežejo do 100 μm v dolžino in okrog 0,4 μm v širino. Filamenti tvorijo razvejane miceloidne strukture, od koder izvira tudi ime za mikoplazme (lat. myces, gliva; plasma, oblika) (Razin, 1996).

Na trdnih gojiščih rastejo v značilnih kolonijah v obliki »ocvrtega jajca«, z osrednjim področjem ugreznjenim v agar, medtem ko območje ob strani leži na agarski površini (Razin, 1996). (Morfologijo kolonij mikoplazem na agarju prikazuje slika 2).



Slika 2: Morfologija kolonij mikoplazem na agarju (Razin, 1996).

Mikoplazme so prokariontske celice brez celične stene (Razin, 1996). Čeprav so filogenetsko sorodne po Gramu pozitivnim bakterijam, jih barvanje po Gramu zaradi odsotnosti celične stene ne obarva. Odsotnost celične stene pri mikoplazmah, opazovanih s pomočjo elektronske mikroskopije, so potrdile tudi kemične analize, s katerimi je bila dokazana odsotnost ključnih komponent kot so peptidoglikan, muramična kislina in diaminopimelična kislina (Madigan in sod., 2003). Posledica odsotnosti teh komponent so značilen polimorfizem individualnih celic, ter odpornost mikoplazem proti beta laktamskim antibiotikom (Hardy, 2005). Mikoplazme kažejo podobnost s protoplasti, vendar so odpornejše proti osmotski lizi, saj njihove citoplazmatske membrane vsebujejo sterole, ki delujejo kot stabilizatorji membran. Poleg sterolov nekatere mikoplazme

vsebujejo dolgoverižne heteropolisaharidne lipoglikane, ki so kovalentno povezani z membranskimi lipidi. Lipoglikani so po strukturi podobni lipopolisaharidom (LPS) po Gramu negativnih bakterij, le da v nasprotju z LPS lipoglikani nimajo lipidne A hrbtenice in fosfata, tipičnega za bakterijski LPS. Tudi lipoglikani stabilizirajo membrano in so pomembni pri pritrjevanju mikoplazem na površinske receptorje. Okužba poskusnih živali je pokazala, da tako kot LPS, tudi lipoglikani lahko stimulirajo tvorbo protiteles (Madigan in sod., 2003).

Filamentoznim celicam *M. pneumoniae*, *M. genitalium* in nekaterim drugim patogenim mikoplazmam pritrnitev na gostiteljske eukariotske celice omogoča poseben koničast organel, ki ga imajo na terminalnem delu (Razin, 1996).

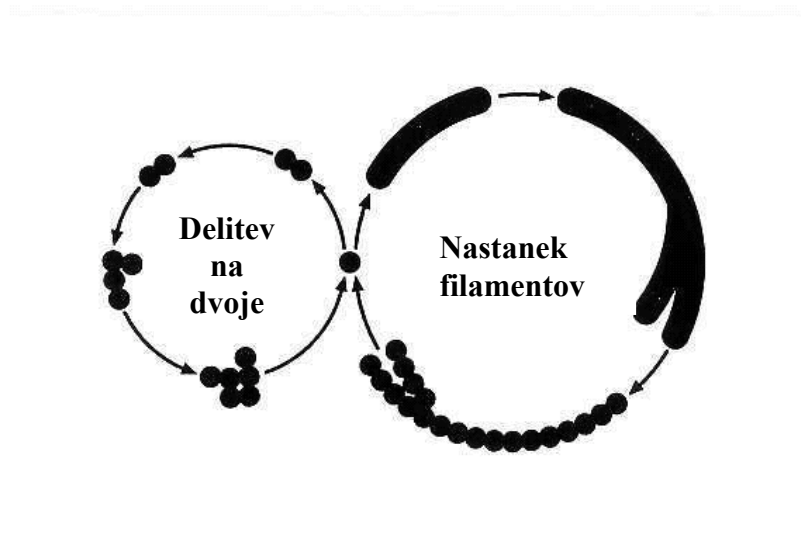
Mikoplazme se gostiteljskemu imunskemu odzivu izognejo z spreminjanjem površinskih antigenov (Jensen, 2006). Glavne antigenske determinante bakterij razreda *Mollicutes* predstavljajo površinsko izpostavljeni membranski proteini (Arber, 2000). Do antigenских variacij vodita dva različna mehanizma (Jensen, 2006). Patogen lahko kot odgovor na spremembo v okolju, s signalnimi transdukcijskimi potmi regulira ekspresijo virulenčnih faktorjev, ali pa lahko celotna mikrobna populacija spontano in naključno ustvari nove fenotipe, ki se lahko izognejo imunskemu odzivu gostitelja (Razin, 1998).

Mikoplazme imajo malo regulatornih genov, ki bi lahko služili kot senzorji spreminjajočega se okolja in le nekaj genov, ki kodirajo transkripcijske dejavnike. Izogibanje imunskemu odgovoru gostitelja in prilagoditev na okolje pri mikoplazmah temelji na spreminjanju površinskih antigenov (Rottem, 2003). Bakterije so razvile različne mehanizme s katerimi ustvarjajo pogoste intragenomske spremembe v nukleotidnih sekvencah ali DNK konformacijah (Arber, 2000). Zanimivo je, da s podobnimi mehanizmi tudi gostiteljski organizmi ustvarjajo naključno različne B limfocite (Moxon in sod., 1994).

Glede na zelo okrnjeno naravo genetskih informacij pri mikoplazmah, je število genov, ki sodelujejo pri spreminjanju površinsko izpostavljenih antigenov presenetljivo visoko (Citti in sod., 1997).

Pomembno vlogo pri celični delitvi naj bi imele adhezijske beljakovine (Jensen, 2006). Glavna adhezijska beljakovina P1 bakterije *M. pneumoniae* (beljakovina MgPa pri bakteriji *M. genitalium*), je pri vseh celicah, ki so pritrjene, locirana na enem polu. Pri določanju vsebnosti DNK v celicah je bilo ugotovljeno, da so imele celice z le enim žariščem beljakovine P1 na enem koncu celice manjšo količino DNK, kot celice, pri katerih sta bili prisotni dve žarišči beljakovine P1. Celice, ki so imele na obeh polih celice žarišča beljakovine P1, so vsebovale največ DNK, kar kaže na to, da nov organel za pritrjanje nastane v bližini starega, potem pa pred delitvijo celice na dvoje potuje na nasprotni pol (Seto in sod., 2001).

Mikoplazme imajo poseben način razmnoževanja, ki je prilagojen majhni genomski informaciji in parazitskemu načinu življenja (Miyata in sod., 1999). Razmnožujejo se z delitvijo na dvoje, vendar lahko delitev citoplazme zaostaja za podvajanjem genoma, rezultat česar je nastanek večjedrnih filamentov. Kasneje tudi večjedrni filamenti oblikujejo manjše kokoidne oblike (Razin, 1996). (Oba načina razmnoževanja pri mikoplazmah kaže slika 3).



Slika 3: Shematski prikaz obeh načinov razmnoževanja pri mikoplazmah (Razin, 1996).

Podvojitev DNK vrste *M. capricolum* se prične v bližini gena *dnaA* in poteka v obeh smereh kromosoma. Pomnožena kromosoma potujeta vsak na svoj pol, s čimer je zagotovljeno, da hčerinski celici dobita DNK. Pomnoževanje sloni na delitvi na dvoje, do katere pride šele, ko je podvojitev DNK končana (Miyata in sod., 1999).

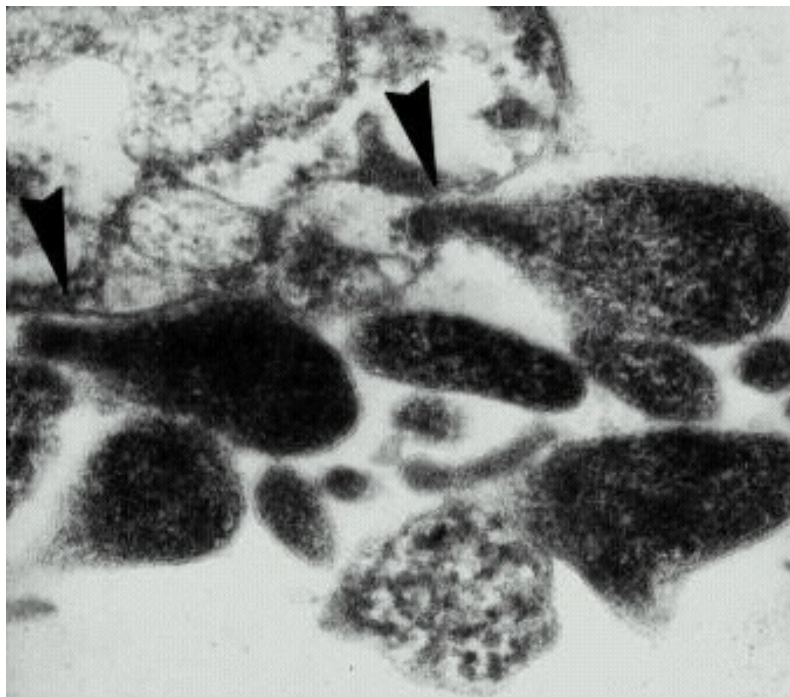
2.2 MYCOPLASMA genitalium

David Taylor-Robinson je leta 1980 z namenom, da bi izoliral spiroplazme, v transportnem gojišču za klamidije imenovanem 2SP prenesel vzorce brisov uretre 13 moških z ne-gonokoknim uretritisom v laboratorij Joe Tully-a v Maryland v Ameriki (Taylor- Robinson, 1996). Tully in sod. so brise uretre moških z ne-gonokoknim uretritisom prenesli v gojišče imenovano SP4 in jih inkubirali pri 37° C. Pri dveh vzorcih je bila po več kot 50 dneh inkubacije vidna sprememba barve gojišča, ki je bila posledica fermentacije glukoze. Vzorce so inokulirali na gojišče z agarjem, kjer so se pojavile kolonije v obliki »ocvrtega jajca«, tipične za mikoplazme (Tully in sod., 1981). Izkazalo se je, da sta bila dobljena seva serološko oddaljena od ostalih vrst mikoplazem, zato so ju kasneje poimenovali seva G-37 in M-30 bakterije *M. genitalium* (Tully in sod., 1983). Kljub ponovnim poskusom izolacije sevov M-30 in G-37 iz prvotne kužnine, po zamrznitvi in odtajanju vzorca, izolacija ni bila več uspešna (Jensen, 2006). (Preglednica 1 prikazuje vse poznane seve *M. genitalium*).

Preglednica 1: Poznani sevi *Mycoplasma genitalium* in mesto izolacije (Jensen, 2006)

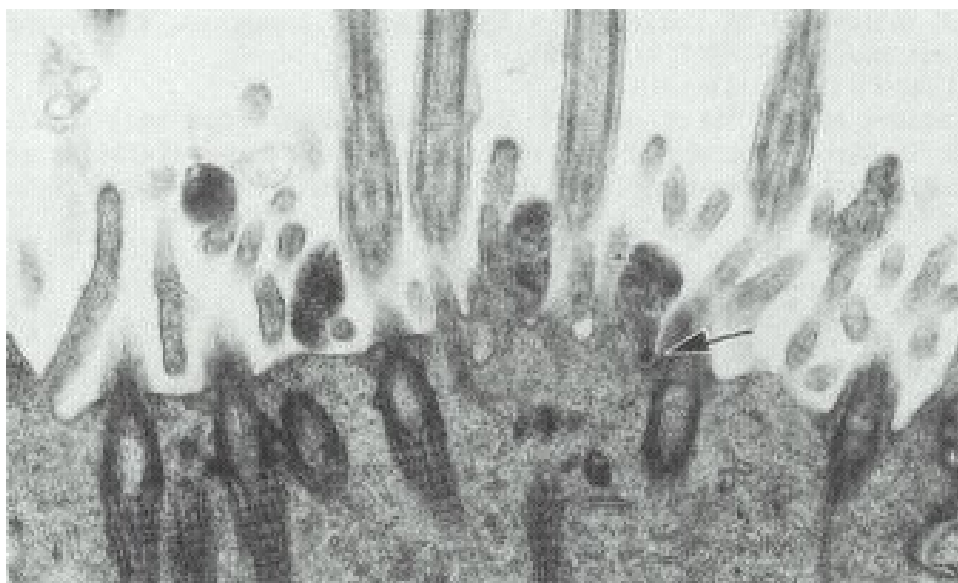
Poimenovanje sevov <i>M. genitalium</i>	Mesto izolacije sevov <i>M. genitalium</i>
G-37	Sečnica
M-30	Sečnica
R 32G	Žrelo
Tw 10-6G	Žrelo
Tw 10-5G	Žrelo
Tw 48-5G	Žrelo
UTMB-10G	Sklepna tekočina
M2282	Sečnica
M2288	Sečnica
M2300	Sečnica
M2321	Sečnica
M2341	Sečnica
M6090	Sečnica
M6151	Sečnica

M. genitalium je ploščate oblike, je gibljiva (Seto in sod., 2001) in ima terminalno koničasto strukturo, ki jo uporablja za pritrditev na gostiteljske celice (Jensen, 2006). (Pritrditev *M. genitalium* na celice Vero prikazuje slika 4). Za pritrditev je odgovorna predvsem glavna adhezijska beljakovina, imenovana MgPa (Jensen, 2006). Bakterija doseže povprečno hitrost gibanja 0,1 μ /s (Taylor-Robinson in sod., 2000).



Slika 4: Slika prikazuje pritrditev bakterije *Mycoplasma genitalium* na celice Vero. Puščica označuje koničasto strukturo bakterije *Mycoplasma genitalium* (Jensen, 2006).

Pritrditev bakterije *M. genitalium* na gostiteljske celice je predpogoj za okužbo. Proces je posredovan preko membransko vezanih komponent, imenovanih adhezini. Pri bakterijah *M. pneumoniae* in *M. genitalium* so adhezine intenzivno preučevali (Jensen, 2006). Obe vrsti imata adhezinske molekule na koničasti strukturi polarne celice (Razin in sod., 1992), s katerimi se lahko vežeta na eukariotske celice, kot so celice Vero (Jensen in sod., 1994), *M. genitalium* pa se lahko veže tudi na epitelne celice jajcevoda pri ženskah (Collier in sod., 1990). (Vezavo bakterije *M. genitalium* na celice jajcevoda prikazuje slika 5).

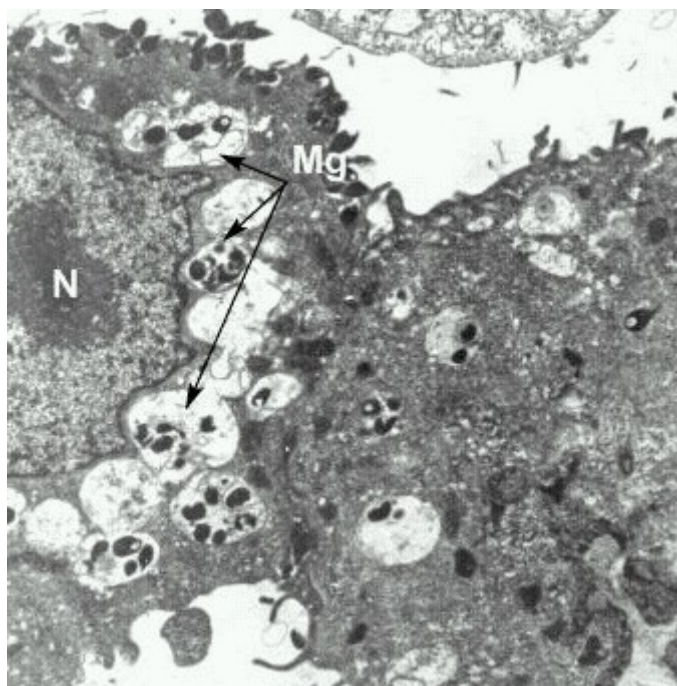


Slika 5: Elektronska mikroskopija vezave bakterije *Mycoplasma genitalium* na celice jajceveda pri ženskah (Jensen, 2006).

V sedemdesetih in osemdesetih letih je večina opazovanj nakazovala na zunajcelično lokacijo mikoplazem (Jensen, 2006). Znotrajcelično preživetje *M. genitalium* in *M. pneumoniae* so Dallo in sod. dokazali s šest mesečno gojitvijo bakterij v celicah HEp-2 v gojišču, z visoko koncentracijo gentamicina. Ker sta obe vrsti bakterij občutljivi na antibiotik gentamicin, poleg tega pa gentamicin ne more prehajati preko membran celic HEp-2, so preživele lahko le tiste bakterije, ki so bile zmožne znotrajcelične perzistence. Zanimivo je, da bakterije *M. genitalium* po znotrajcelični gojitvi niso uspeli več gojiti na gojišču, perzistenco bakterije v celicah v vseh šestih mesecih pa so dokazovali z reakcijo PCR (Dallo in sod., 2000).

Mernaugh in sod. so uporabili tipski sev G-37 in človeške fibroblaste pljuč za študij kinetike in molekularnega mehanizma, ki sodeluje pri okužbi človeških fibroblastnih celic pljuč z *M. genitalium*. Bakterije so se takoj pritrdile na površinske receptorje celic. Po eni uri so celice pričele invaginirati celično membrano, po 12 urah je bilo v vakuolah vidno precejšnje število celic *M. genitalium*, po 96 urah pa so okužene celice že skoraj popolnoma lizirale (Mernaugh in sod., 1993).

Pri izolaciji mikoplazem v celični kulturi Vero, so Jensen in sod. preučevali morfologijo danskega seva *M. genitalium* M2300 z elektronskim mikroskopom. Izkazalo se je, da *M. genitalium* vstopa v celice najprej s koničato strukturo. Znotraj celic so se bakterije nahajale v vakuolah, ki so bile pogosto v bližini jedra. (Znotrajcelično lokacijo *M. genitalium* prikazuje slika 6). Mikoplazme so okužile le 10% celic Vero, zato še ni jasno ali je to posledica različne starosti celic ali pa gre le za različno porazdelitev mikoplazem med celicami Vero (Jensen in sod., 1994).



Slika 6: Dve Vero celici, pri katerih je vidno tako pritrdjanje mikoplazem na celično membrano, kot tudi znotrajcelična lokacija bakterije *Mycoplasma genitalium*. Mikoplazme v znotrajceličnih vakuolah, ki se nahajajo blizu jedra, so označene s puščicami (Jensen, 1994).

Študije tako nakazujejo, da je bakterija *M. genitalium* fakultativni znotrajcelični patogen, saj je v *in vitro* pogojih zmožna preživeti tako znotraj kot tudi zunaj celic. Ali se to dogaja tudi v *in vivo* pogojih, še ni znano. Glede na to, da se je antibiotična terapija sprva pri nekaterih pacientih pokazala kot uspešna, kasneje pa je prišlo do relapsa, bi lahko sklepali, da se tak način parazitiranja pojavlja tudi *in vivo* (Jensen, 2006).

Mikoplazme, vključno z *M. genitalium* so običajno občutljive za antibiotike, ki preprečujejo sintezo beljakovin in so zaradi odsotnosti celične stene odporne proti

antibiotikom, ki vplivajo na sintezo celične stene. Večina učinkovitih antibiotikov za zdravljenje okužb z *M. genitalium* ima bakteriostatično delovanje (Ishihara in sod., 2004). Antibiotiki le upočasnijo rast mikoplazem, za popolno uničenje pa je potreben tudi učinkovit imunski sistem (Taylor-Robinson in sod., 2000). Tetraciklin, eritromicin in nekateri novejši makrolidi, kot so klaritromicin ter azitromicin, so se izkazali za zelo uspešne pri zdravljenju okužb z *M. genitalium* (Ishihara in sod., 2004; Renaudin in sod., 1992). Med najbolj učinkovite antibiotike za zdravljenje okužb z *M. genitalium* uvrščamo azitromicin (Falk in sod., 2003). Med zelo učinkovite spadajo tudi kinoloni, kot npr. sparfloxacin, grepafloxacin, gemifloxacin ter trovafloxacin, medtem ko ofloxacin in ciprofloxacin kažeta le delno učinkovitost (Ishihara in sod., 2004). Deguchi in sod. poročajo tudi o odpornosti proti florokinolonom, ki je povezana z mutacijami v genih *gyrA* in *parC* *M. genitalium* (Deguchi in sod., 2001). Zaradi težavne gojitve *M. genitalium*, je le malo podatkov o minimalnih inhibitornih koncentracijah antibiotikov, ki delujejo na to bakterijo (Ishihara in sod., 2004). Hannan je v študiji o občutljivosti *M. genitalium* na antibiotike ugotovil, da so bili vsi testirani sevi *M. genitalium* zelo občutljivi za antibiotike iz skupine makrolidov, z minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) za eritromicin 0,1 mg/l in MIK za azitromicin 0,005 mg/l. Med skupinami antibiotikov, ki so še zavirali rast vseh sevov *M. genitalium*, je bila skupina novih kinolonov, kot je sparfloxacin z MIK 1 mg/l. MIK najmanj občutljivih sevov na tetraciklin je dosegla 10 mg/l (Hannan, 1998). To je zelo pomemben podatek, saj so tetraciklini zdravila izbire pri zdravljeju ne-gonokoknega uretritisa, ker so zelo učinkoviti pri zdravljenju okužb z *C. trachomatis*. Številne študije kažejo na to, da tetraciklinsko ali kinolonsko zdravljenje uretritisa ni vedno zadostno za zdravljenje okužb z *M. genitalium* (Jensen, 2006).

2.3 TAKSONOMSKA RAZVRSTITEV MIKOPLAZEM

Sprva so mikoplazme uvrščali med viruse, saj so prehajale preko filtrov z velikostjo por 0,45 μ ali celo 0,22 μ (Jensen, 2006). Kasneje so ugotovili, da so to bakterije, ker imajo sledeče lastnosti:

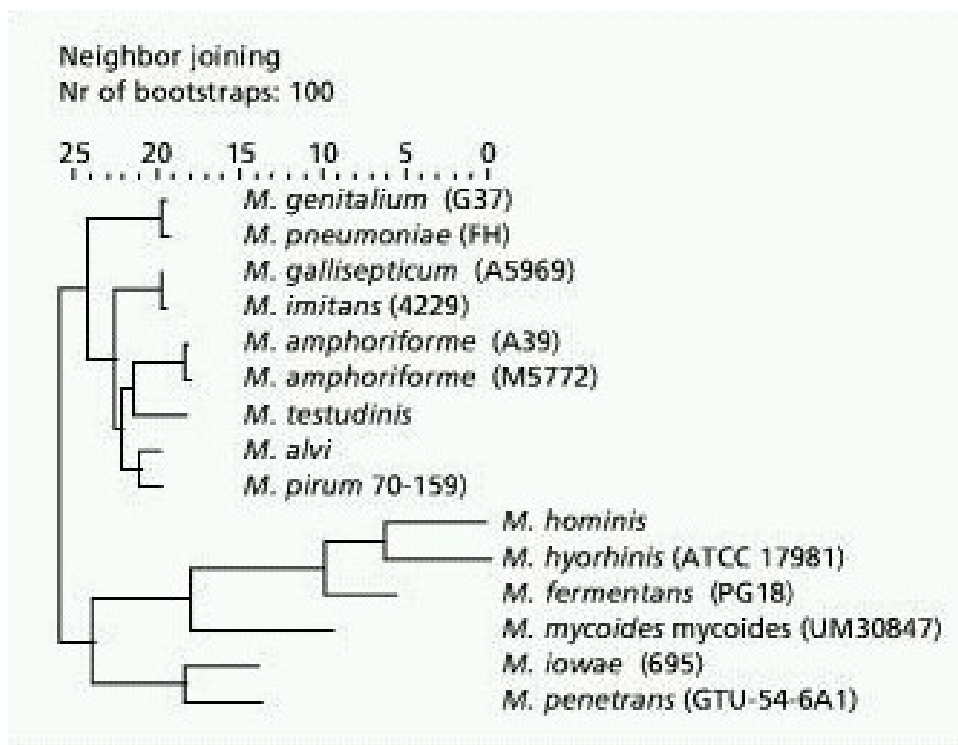
- razmnožujejo se z delitvijo na dvoje
- imajo DNK in RNK
- rastejo na umetnih bakterioloških gojiščih (Murray in sod., 2005).

V petdesetih letih so bile nekatere vrste mikoplazem uvrščene v skupino bakterij L- oblike, ki je tipična za bakterije brez celične stene. Šele v zgodnjih šestdesetih letih so mikoplazme uvrstili v taksonomski sistem (Jensen, 2006). Mikoplazme uvrščamo v razred *Mollicutes* (lat. mollis, nežen; cutis, površina) (Baseman in sod., 1997). Razred organizmov *Mollicutes* je razdeljen v pet družin s skoraj dvesto vrstami. Za pet vrst je znano, da lahko povzročajo bolezen pri ljudeh (Murray in sod., 2005). Red *Mycoplasmatales*, ki vključuje eno družino *Mycoplasmataceae* je za ljudi najpomembnejši. V družino *Mycoplasmataceae* uvrščamo dva rodova, in sicer *Mycoplasma* in *Ureaplasma*. Rod *Mycoplasma* obsega več kot 100 vrst, 13 od teh vrst je sestavni del človeške flore. Dve vrsti iz rodu *Ureaplasma*, *U. urealyticum* in *U. parvum* (prej znana kot *U. urealyticum*, biovar parvo) sta pogosto navzoči v urogenitalnem traktu ljudi (Jensen, 2006) in lahko povzročata vnetne procese. V urogenitalnem traktu sta še patogeni mikoplazmi *M. hominis* in *M. genitalium*, medtem ko je poznana mikoplazma, ki povzroča okužbe dihal *M. pneumoniae*.

Mikoplazme so se najverjetneje preko degenerativne evolucije razvile iz po Gramu pozitivnih prednikov in so filogenetsko najbolj sorodne klostridijem. Da gre pri mikoplazmah za razvoj v smeri zmanjšanja genoma, domnevajo na podlagi primerjav baznih sekvenc zelo konzervativnih ribosomskih molekul RNA, zlasti molekul 16S rRNA (Razin, 1996).

Primerjava 16S rRNK genskih sekvenc uvršča *M. genitalium* v klaster *M. pneumoniae*, z najbližnjimi sorodniki, kot so *M. pneumoniae*, *M. alvi*, *M. gallisepticum*, *M. imitans*, *M.*

pirum in *M. testudinis* (Jensen, 2006). Pred kratkim so iz respiratornega trakta izolirali še eno vrsto mikoplazem te skupine, ki bo najbrž poimenovana v *M. amphoriforme* (Webster in sod., 2003). (Filogenetsko drevo na podlagi sekvenc 16S rRNK kaže slika 7).



Slika 7: Filogenetsko drevo na podlagi genskih sekvenc 16S rRNA (Jensen, 2006).

Poznano je, da so vrste mikoplazem z majhnim genom zelo podvržene mutacijam, kar bi lahko vodilo v nadaljno hitro evolucijo (Rogers in sod., 1985).

2.4 GENOM *M. genitalium*

Mycoplasma genitalium ima najmanjši genom kateregakoli prostoživečega organizma, ki ga lahko izoliramo v čisti kulturi (Glass in sod., 2005). Genom bakterije *M. genitalium* obsega 580 074 bp in vsebuje le gene, pomembne za preživetje bakterije (Fraser in sod., 1995; Koonin, 2000). Krožni genom *M. genitalium* vsebuje 517 genov (Fraser in sod., 1995), od katerih jih 482 kodira beljakovine. Tako njen genom predstavlja približek minimalnega števila genov, ki so potrebni za sintezo beljakovin (Glass in sod., 2005).

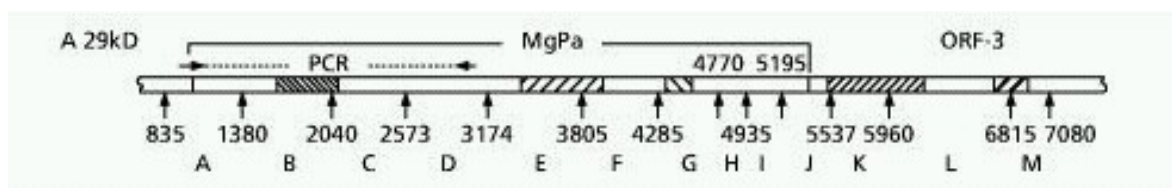
Sekvenca genoma *M. genitalium* je bila objavljena leta 1995. *M. genitalium* je tako za *H. influenzae* postala druga prosto-živeča bakterija, katere genom ima poznano nukleotidno zaporedje (Fraser in sod., 1995). Večina mikoplazem ima v genomu nizek delež G+C baznih parov, med 24-33 %. Podobno kot pri drugih mikoplazmah je tudi pri *M. genitalium* delež G+C v genomu nizek, saj predstavlja le 32 %, delež G+C v nekaterih genih, kot npr. v rRNK pa lahko doseže tudi do 44 % (Jensen, 2006).

Večina objavljenih raziskav temelji na PCR za dokaz gena *MgPa* (Jensen in sod., 1991, Uno in sod., 1997; Cohen in sod., 2002) in gena za 16S rRNA (Sasaki in sod., 1992; Yoshida in sod., 2002a). Gen *MgPa* je velikosti 4334 bp in kodira sintezo glavnega adhezina, s katerim se *M. genitalium* pritrdi na celice migetalčnega epitelijskega gostitelja (Jensen, 2006). Znano je tudi, da so znotraj gena *MgPa* variabilne regije (Peterson in sod., 1995). Genska sekvenca 16S rRNA je relativno stabilna in vsebuje malo polimorfizmov znotraj populacije *M. genitalium* (Eastick in sod., 2003).

Navzočnost številnih adhezinov bakterije *M. genitalium* je dobro dokumentirana, vedno več pa je tudi informacij o njihovih interakcijah z gostiteljskimi celicami. Pri *M. pneumoniae* je glavni adhezin P1, ki je zelo podoben adhezinu *MgPa* bakterije *M. genitalium*. Operon *MgPa* bakterije *M. genitalium* sestavljajo trije geni: ORF-1 (29 kDa beljakovina), ORF-2 (*MgPa*) in ORF-3 (MG192; 114 kDa beljakovina). (Nomenklatura operona *MgPa* prikazuje slika 8). Funkcija gena ORF-1 ni znana (Jensen, 2006). Gena *MgPa* in ORF-3 sta nujno potrebna za sintezo beljakovin, ki omogočajo pritrjevanje

bakterije na gostiteljske celice (Burgos in sod., 2006) in imata ponavljajoča se zaporedja v kromosomu (Jensen, 2006).

Znotraj genoma *M. genitalium* so razporejeni ponavljajoči se elementi DNK, ki vsebujejo sekvence operona MgPa (MgPa otoki) (Fraser in sod., 1995). Otoki MgPa neposredno ne izražajo za beljakovine kodirajočih sekvenc, vendar domnevajo, da prihaja do rekombinacij med temi ponavljajočimi se elementi in operonom MgPa in tako rekombiniranje naj bi vplivalo na nastanek antigenske variacije beljakovin MgPa. V *M. genitalium* so našli 9 ponavljajočih se elementov, ki sestavljajo oddaljene regije operona MgPa (Peterson in sod., 1995). Identiteta sekvenc med ponovitvami in sekvenco operona je 78-90 %. Ponovitve skupaj z sekvenco operona MgPa predstavljajo 4,7 % celotne genomske sekvence (Fraser in sod., 1995).



Slika 8: Nomenklatura operona MgPa. Območja s ponavljajočimi zaporedji so črtasto označena (Jensen, 2006).

Pomembna adhezijska beljakovina je tudi P32, ki se nahaja v koničasti strukturi bakterije *M. genitalium*. Gen, ki kodira to beljakovino je v operonu, ki je oddaljen od operona MgPa in se izraža sočasno s pomožnimi adhezijskimi beljakovinami (Reddy in sod., 1995). Pomožne adhezijske beljakovine so pomembne za kopičenje adhezijskih molekul na koničasti strukturi, poleg tega pa z vzdrževanjem celične oblike delujejo tudi kot citoskelet (Razin in sod., 1992). Vlogo pri adheziji bi lahko imela tudi membranska vezana površinska beljakovina, imenovana MG075 (Fraser in sod., 1995). Z metodo AFLP je bilo dokazano, da je gen MG075 variabilen med sevi (Kokotovic in sod., 1999).

Alvarez in sod. so ugotovili, da gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza deluje kot ligand pri vezavi *M. genitalium* na celice vaginalne in cervikalne sluznice (Alvarez in sod., 2003).

V nasprotju z drugimi bakterijami, vendar podobno kot v mitohondrijih, pri mikoplazmah kodon UGA ne kodira STOP signala, temveč aminokislino triptofan (Jensen, 2006).

Glass in sod. so v študiji z uporabo transpozonske insercije ugotavljali minimalno število genov, potrebnih za preživetje bakterije *M. genitalium*. Tako domnevajo, da je potrebnih za rast bakterije 43 RNK kodirajočih genov in 387 genov, ki kodirajo sintezo beljakovin (Glass in sod., 2005). To predstavlja večje število nujno potrebnih genov, kot so domnevali v prejšnji študiji, ko so predpostavili, da *M. genitalium* za uspešno rast v laboratorijskih pogojih potrebuje le 265-350 genov, ki kodirajo beljakovine (Hutchison in sod., 1999). Glass in sod. so tudi ugotovili, da ima bakterija od vseh genov, ki kodirajo beljakovine, 28 % protein kodirajočih genov, katerih funkcija ni znana (Glass in sod., 2005).

2.5 EPIDEMIOLOGIJA OKUŽB Z BAKTERIJO *M. genitalium*

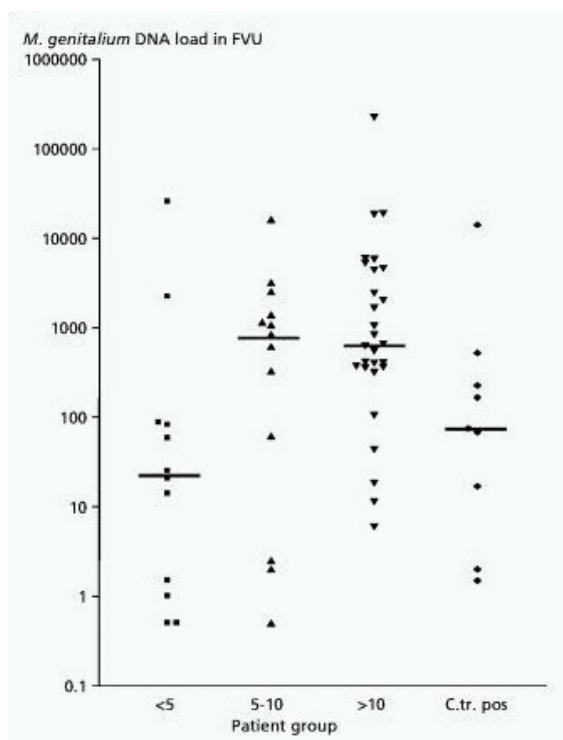
O epidemiologiji *M. genitalium* je še dokaj malo znanega (Simms in sod., 2003). Zaradi težavne gojitve *M. genitalium*, je bilo od odkritja te bakterije sprva objavljenih le malo epidemioloških študij (Jensen, 2006). Obsežnejše klinične študije so bile mogoče šele z uvedbo testov PCR (Jurstrand in sod., 2005). Z metodo PCR so v študijah ugotavljali prevalenco okužb s to bakterijo pri bolnikih z akutnim ne-gonokoknim uretritisom ter pri asimptomatskih preiskovancih (Jensen in sod., 1991). V prvi klinični študiji o epidemiologiji okužb z bakterijo *M. genitalium*, so Jensen in sod. z metodo PCR pregledali 99 različnih vzorcev moških, ki so obiskali kliniko za spolno prenosljive bolezni. DNK *M. genitalium* so dokazali v 17 (17 %) brisih sečnice, medtem ko v rektalnih brisih in brisih žrela niso dokazali DNK *M. genitalium*. Ta raziskava je pokazala, da je primarno mesto okužbe z *M. genitalium* urogenitalni trakt. Ugotovili so, da je bilo statistično značilno več moških z ne-gonokoknim uretritisom pozitivnih na *M. genitalium* (13/48, 27 %), kot tistih brez uretritisa (4/47, 9 %). Pri moških z uretritisom je bila okužba z *M. genitalium* pogostejše dokazana pri bolnikih, ki niso imeli okužbe s *C. trachomatis* ali z *N. gonorrhoeae* (12/34, 35 %), kot pri tistih z klamidijskim ne-gonokoknim uretritisom (1/14, 7 %) (Jensen in sod., 1993).

Jensen je v svoji doktorski disertaciji povzel rezultate 23 študij, vključno z tremi, ki niso vključevale kontrolne skupine. Študije so skupno vključevale 5455 bolnikov, pri katerih je bila prevalenca okužb z *M. genitalium* (470/2261) 20,8 % pri moških bolnikih z ne-gonokoknim uretritisom, pri osebah brez ne-gonokoknega uretritisa, ki so predstavljali kontrolo, (124/2107) 5,9 % (Jensen, 2006).

Na podlagi podatkov 16 kliničnih študij je Jensen objavil prevalenco *M. genitalium* pri moških z ne-klamidijskim ne-gonokoknim uretritisom. V teh študijah je bila prevalenca *M. genitalium* pri moških z ne-gonokoknim uretritisom (345/1786) 19,3 %, prevalenca *C. trachomatis* pa je bila 27,7 %. Z izjemama v dveh študijah, je bila prevalenca okužb z *M. genitalium* vedno višja pri bolnikih z ne-klamidijskim ne-gonokoknim uretritisom, kot pri bolnikih z ne-gonokoknim uretritisom. Med bolniki z ne-klamidijskim ne-gonokoknim

uretritisom je bila prevalenca (283/1290) 21,9 %, pri kontrolnih skupinah oseb brez uretritisa pa je bila prevalenca (93/647) 6,0 % (Jensen, 2006).

M. genitalium najpogosteje povzroča uretritis pri moških neodvisno od okužbe s *C. trachomatis* (Jensen, 2006). Nadalje, Yoshida in sod. so leta 2002 dokazali višje število kopij DNK *M. genitalium* v vzorcih prvega jutranjega urina pacientov z ne-klamidijskim ne-gonokoknim uretritisom, v primerjavi z rezultati testiranja asimptomatskih pacientov (Yoshida in sod., 2002a). Prav tako je Jensen s sod. leta 2004 z uporabo TaqMan kvantitativnega testa PCR pokazal, da je pri vzorcih prvega jutranjega urina in brisih uretre pacientov z uretritisom signifikantno višje število kopij genoma *M. genitalium*, kot pri kontrolnih skupinah asimptomatskih preiskovancev (Jensen in sod., 2004b). (Število kopij genoma *M. genitalium* pri asimptomatskih preiskovancih, ter pri bolnikih z uretritisom prikazuje slika 9).



Slika 9: Število kopij genoma *Mycoplasma genitalium* pri asimptomatskih preiskovancih, ter pri pacientih z uretritisom (Jensen in sod., 2004b).

Študije, ki so potekale od leta 1993 do leta 2002 kažejo, da je prevalenca mikoplazem pri moških z akutnim ne-gonokoknim uretritisom od 13-42 %, pri asimptomatskih moških pa

od 0-15 %. Pri pacientih z akutnim ne-klamidijskim ne-gonokoknim uretritisom je prevalenca *M. genitalium* od 18-46 % in je v večini študij signifikantno višja, kot pri asimptomatskih moških (Ishihara in sod., 2004). (Prevalenco okužb z *M. genitalium* prikazuje preglednica 2).

Preglednica 2: Prevalenca okužb z *Mycoplasma genitalium* pri moških z akutnim ne-gonokoknim uretritisom, akutnim ne-klamidijskim ne-gonokoknim uretritisom, ter pri asimptomatskih moških (Ishihara in sod., 2004).

References	Country	Year	No. of <i>M. genitalium</i> positive/No. of studies (%)		
			NGU	Non-chlamydial NGU	Asymptomatic
Homer et al. [8]	UK	1993	24/103 (23.3)	16/58 (27.6)	3/53 (5.7)
Jensen et al. [9]	Denmark	1993	13/48 (27.1)	12/34 (35.3)	4/47 (8.5)
Blanchard et al. [10]	USA	1993	9/64 (14.1)	—	—
de Barbeyrac et al. [11]	France	1993	8/48 (16.7)	—	—
Deguchi et al. [12]	Japan	1995	17/114 (14.9)	14/76 (18.4)	0/28 (0)
Uno et al. [13]	Japan	1997	—	—	2/187 (1.1)
Mazda et al. [14]	Japan	1998	10/76 (13.2)	9/34 (26.5)	0/21 (0)
Gambini et al. [15]	Italy	2000	52/178 (29.2)	26/110 (23.6)	1/23 (4.3)
Bjornelius et al. [16]	Sweden	2000	13/50 (26.0)	13/36 (36.1)	5/51 (9.8)
Johannisson et al. [17]	Sweden	2000	18/115 (15.7)	17/73 (23.3)	1/118 (0.8)
Keane et al. [18]	UK	2000	12/36 (33.3)	10/22 (45.5)	1/11 (9.1)
Totten et al. [19]	USA	2001	27/121 (22.3)	24/85 (28.2)	5/117 (4.3)
Pepin et al. [20]	West Africa	2001	—	37/209 (17.7)	30/339 (8.8)
Morency et al. [21]	Central Africa	2001	53/127 (41.7)	41/105 (39.0)	15/100 (15.0)
Taylor-Robinson et al. [22]	South Africa	2002	16/96 (16.7)	16/81 (19.8)	15/169 (8.9)
Mera et al. [23]	USA	2002	16/52 (30.8)	9/32 (28.1)	10/142 (7.0)

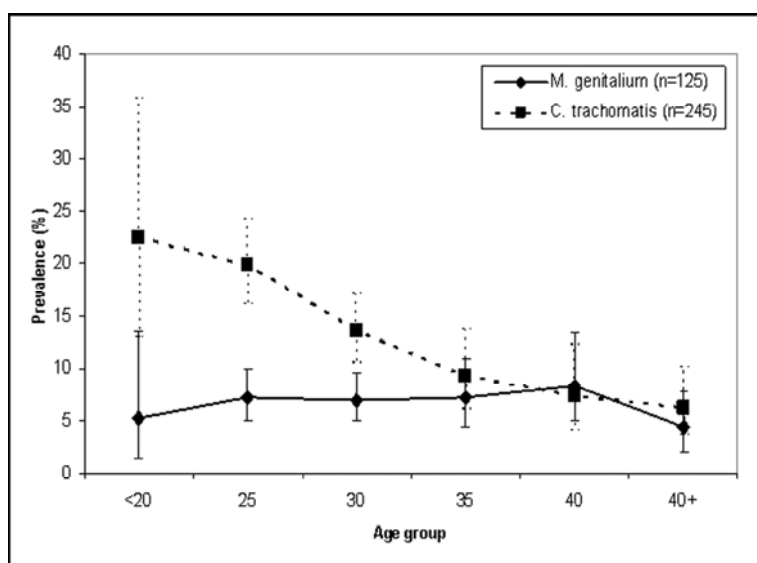
Jensen je s pregledom študij, objavljenih od 1993 do 2002, kjer je bilo v raziskavo vključenih 1233 moških z ne-klamidijskim ne-gonokoknim uretritisom prišel do zaključka, da je povprečna prevalenca okužb z *M. genitalium* pri moških z ne-klamidijskim ne-gonokoknim uretritisom 21,7 % od 1233 vključenih v raziskavo, medtem ko je povprečna prisotnost *M. genitalium* pri moških brez uretritisa dokazana v 6 % od 1537 moških vključenih v raziskavo (Jensen, 2004a).

Podatki različnih študij kažejo na nizko prevalenco *M. genitalium* pri moških z gonokoknim uretritisom, ki je signifikantno nižja od prevalence *C. trachomatis* pri moških z gonokoknim uretritisom (Ishihara in sod., 2004). Hooton in sod. so že leta 1988 z uporabo prob DNK ugotavljali prisotnost *M. genitalium* v brisih uretre bolnikov z gonokoknim uretritisom. *M. genitalium* so dokazali pri 2 od 19 (10,5 %) bolnikov z

gonokoknim uretritisom (Hooton in sod., 1988). V nasprotju z to ugotovitvijo, Taylor-Robinson in Jensen s sod. z metodo PCR ob pregledu brisov sečnice štirih in devetih bolnikov z gonokoknim uretritisom niso uspeli dokazati DNA *M. genitalium* (Taylor-Robinson, 1995; Jensen in sod., 1993). Na Japonskem so Uno in sod. z metodo PCR v brisih sečnice 45 moških z gonokoknim uretritisom dokazali *M. genitalium* pri dveh bolnikih (4,4 %) (Uno in sod., 1996).

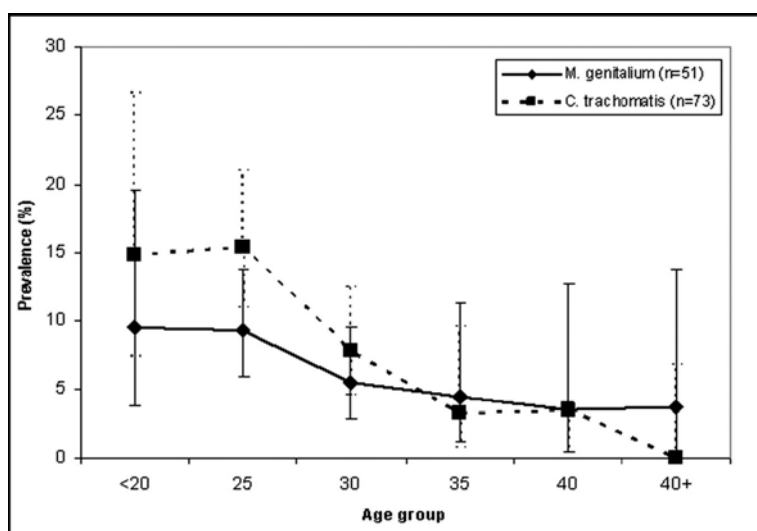
Prevalenčne študije moških, ki so obiskali kliniko za spolno prenosljive bolezni na Danskem, so pokazale, da je *M. genitalium* v 20-30 % vzrok ne- gonokoknega uretritisa (Björnelius in sod., 2004).

Jensen in sod. so v študijo, ki je potekala od avgusta 1997 do novembra 2001, vključili 1852 pacientov in 753 pacientk, ki so prišli na kliniko za spolno prenosljive bolezni na Švedskem. Preiskovance so testirali z metodo PCR na okužbo s *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* in *M. genitalium*, poleg tega pa so pri preiskovancih ugotavljali tudi prisotnost uretritisa in vnetja materničnega vratu. Prevalenca okužb z *M. genitalium* pri moških med 20 in 40 leti je bila (126/1852) 6,8 %. Povprečna starost moških okuženih z *M. genitalium* je bila 27,8 let (Jensen in sod., 2004c). (Prevalenco okužb z *M. genitalium* in *C. trachomatis* pri moških, ki so obiskali kliniko za spolno prenosljive bolezni na Švedskem prikazuje slika 10).



Slika 10: Prevalenca okužb z bakterijama *Mycoplasma genitalium* in *Chlamydia trachomatis* pri moških, ki so med avgustom 1997 in novembrom 2001 obiskali kliniko za spolno prenosljive bolezni na Švedskem. (Jensen in sod., 2004c).

Prevalenca okužb z *M. genitalium* pri ženskah, starih od 20 do 40 let je bila (51/753) 6,8 % in je bila višja pri ženskah starih okrog 20 let (9,5 %), kot pri ženskah, ki so starejše od 35 let (3,5 %). Povprečna starost *M. genitalium* pozitivnih žensk je bila 23,3 leta (Jensen in sod., 2004c). (Prevalenco okužb z bakterijama *M. genitalium* in *C. trachomatis* pri ženskah, ki so obiskale kliniko za spolno prenosljive bolezni na Švedskem prikazuje slika 11).



Slika 11: Prevalenca okužb z bakterijama *Mycoplasma genitalium* in *Chlamydia trachomatis* pri ženskah, ki med avgustom 1997 in novembrom 2001 obiskale kliniko za spolno prenosljive bolezni na Švedskem (Jensen in sod., 2004c).

2.6 PRENOS OKUŽBE Z *M. genitalium*

Zelo malo je podatkov o prenosu okužbe z *M. genitalium* s spolnim stikom (Jensen, 2006). Keane in sod. so v študiji o prenosu okužb med partnerji vključili 39 moških z ne-gonokoknim uretritisom in njihovih partneric. Okužba z bakterijo *C. trachomatis* je bila odkrita pri 14 moških in šestih (43 %) ženskih partnericah. Okužba z bakterijo *M. genitalium* je bila dokazana pri sedmih (58 %) partnericah od 12 z *M. genitalium* okuženih moških. Okužbo z *M. genitalium* so dokazali tudi pri dveh (9 %) od dvaindvajsetih partnericah moških, ki so bili negativni na *M. genitalium*, medtem ko so okužbo s *C. trachomatis* dokazali pri štirih (11 %) partnericah *C. trachomatis* negativnih moških (Keane in sod., 2000).

Z uporabo metode PCR so Tait in sod. objavili podatek, da se okužba s *C. trachomatis* med partnerji prenaša v 26-68 % (Tait in sod., 2002). Okužba z bakterijo *M. genitalium* naj bi se med partnerji prenašala v podobnih odstotkih (Jensen, 2006).

2.7 BOLEZNI, KI JIH POVZROČA *M. genitalium*

M. genitalium je vrsta mikoplazem, ki pri ljudeh povzroča uretritis (Svenstrup in sod., 2005). Številne študije povezujejo *M. genitalium* z urogenitalnimi simptomi, kot so vnetje maternice, jajcevodov, materničnega vratu, vnetjem v mali medenici, pa tudi z drugimi patološkimi stanji, kot so artritis, pljučnica, napredovanje AIDS-a, kronična utrujenost, ter avtoimunske bolezni (Anagrus in sod., 2002; Baseman in sod., 1988; Deguchi in sod., 2002; Hay in Taylor-Robinson, 1996; Lind in Kristensen, 1987; Manhart in sod., 2003; Tully in sod., 1993; Wang in sod., 1997).

Uretritis je običajno definiran s prisotnostjo več kot petih polimorfonuklearnih levkocitov (PMNL) v vidnem polju brisa, barvanega po Gramu pri 1000-kratni povečavi (Swartz in sod., 1978). Študija v Skandinaviji je pokazala, da je imelo 90 odstotkov bolnikov z ne-gonokoknim uretritisom, pri katerih so odkrili okužbo s *C. trachomatis* ali z *M. genitalium*, več kot deset polimorfonuklearnih levkocitov na vidno polje pri 1000- kratni povečavi (Falk in sod., 2004). Jensen v svoji doktorski dizertaciji navaja, da se okužba z *M. genitalium* pojavlja pri 10-45 % moških z ne-klamidijskim ne-gonokoknim uretritisom (Jensen, 2006).

V primerjavi s študijami bakterije *M. genitalium* pri moških, je bilo objavljenih manj študij, ki so preučevale vlogo *M. genitalium* pri ženskah. Redke študije so preučevale povezavo med okužbo z *M. genitalium* in vnetjem materničnega vratu. Glavni problem pri interpretaciji rezultatov študij je predstavljala spreminjajoča se definicija vnetja materničnega vratu. V nekaterih študijah je za določitev vnetja materničnega vratu zadostovalo 10 polimorfonuklearnih levkocitov (PMNL) v vzorcu brisa materničnega vratu, medtem ko so druge študije definirale vnetje materničnega vratu s prisotnostjo 30 polimorfonuklearnih levkocitov na mikroskopsko polje pri 1000 kratni povečavi (Jensen, 2006).

Simms in sod. so v študiji preučevali 45 žensk s klinično diagnozo vnetja v mali medenici. Z metodo PCR so v vzorcih brisov materničnega vratu našli DNK *M. genitalium* v 9 (16 %) primerih, medtem ko niti eden vzorec izmed 37 kontrol ni bil pozitiven na okužbo z *M.*

genitalium. Pomembno dejstvo je, da so kontrolo predstavljale bolnice, ki so kliniko obiskale zaradi bilateralne podvezave jajcevodov in so bile starejše, kar predstavlja manjše tveganje za spolno prenosljive bolezni (Simms in sod., 2003).

Študije, ki so preučevale povezavo med okužbo z *M. genitalium* in vaginozo, le te niso potrdile (Oakeshott in sod., 2004). Malo je tudi podatkov o vplivu okužbe z *M. genitalium* na nosečnost (Jensen, 2006). Lu in sod. so objavili študijo, v kateri so preučevali predčasni porod. Le 4 % od 124 nosečnic, ki so rodile predčasno, je bilo v drugem tromesečju okuženih z *M. genitalium* (Lu in sod., 2001). Oakeshott in sod. so ugotovili, da je prevalenca nosečnic okuženih z *M. genitalium* v prvem tromesečju (6/915) 0,7 %. Le ena od z *M. genitalium* okuženih nosečnic je splavila, nobena od vključenih v raziskavo pa ni rodila predčasno (Oakeshott in sod., 2004). Prav tako so Labbe in sod. v raziskavi testirali 1014 nosečnic, pri katerih so le v 6 % dokazali okužbo z *M. genitalium*, ki pa ni imela vpliva na potek nosečnosti (Labbe in sod., 2002). Okužba z *M. genitalium* je bila pogostejše prisotna pri ženskah mlajših od 20 let, pri ženskah s sočasno bakterijsko vaginozo, pri Afričankah in pripadnicah Afro - karibskega etničnega izvora, pri ženskah v nižjem socialnem razredu, ter pri samskih ženskah (Oakeshott in sod., 2004).

Zelo malo je tudi znanega o prenosu okužbe z *M. genitalium* ob porodu iz matere na otroka (Jensen, 2006). Luki in sod. so v študiji, ki je vključevala 47 žensk z tvegano nosečnostjo preučevali pljučnico pri novorojenčkih, pozročeno z *M. genitalium*. Prenos *M. genitalium* iz matere na otroka so dokazali v enem od predčasnih rojstev, pri katerem je otrok utrpel nevarne respiratorne zaplete, vendar študija ni bila podprta s kontrolami, poleg tega pa ni znano tudi to, po kakšnem postopku je potekalo vzorčenje (Luki in sod., 1998).

Dokazi v veliki meri kažejo na to, da je *M. genitalium* patogen urogenitalnega trakta, vendar občasno lahko pride tudi do izven genitalnih okužb. Okužbe respiratornega trakta z bakterijo *M. genitalium* so sporne (Jensen, 2006). De Barbeyrac in sod. so preučevali 75 vzorcev bronhoalveolarnega izpirka (BAL) bolnikov s pljučnimi infiltrati neznane etiologije. Štirje (5 %) vzorci so bili z metodo PCR pozitivni na *M. genitalium*, hkrati pa so pri treh od teh štirih vzorcev z metodo PCR ugotovili, da gre za hkratno okužbo z *M. pneumoniae*. Zanimivo je, da so imeli vsi štirje pridelki PCR prepoznavno mesto za

restriksijski encim *Eco* R1, ki ga ima tipski sev G-37, medtem ko nobeden od osmih pridelkov PCR iz vzorcev urogenitalnega trakta ni imel tega prepoznavnega mesta. Presenetljivo je, da so imeli vsi vzorci respiratornega trakta drugačno prepoznavno mesto restriksijskih encimov, kot so jih imeli vzorci iz urogenitalnega trakta (De Barbeyrac in sod., 1993).

Zaradi podobnih manifestacij bolezni, kot pri okužbi s *C. trachomatis* domnevajo, da tudi *M. genitalium* lahko povzroča spolno pridobljen reaktivni artritis (Jensen, 2006). Henry in sod. so z metodo PCR dokazali DNK *M. genitalium* v 9 (35 %) od 26 vzorcev sklepne tekočine temporomandibularnega sklepa. V isti študiji so v 42 % dokazali okužbo s *C. trachomatis* (Henry in sod., 2000), vendar je sporno vprašanje o specifičnosti laboratorijskih metod, saj niso analizirali kontrolnih vzorcev (Jensen, 2006).

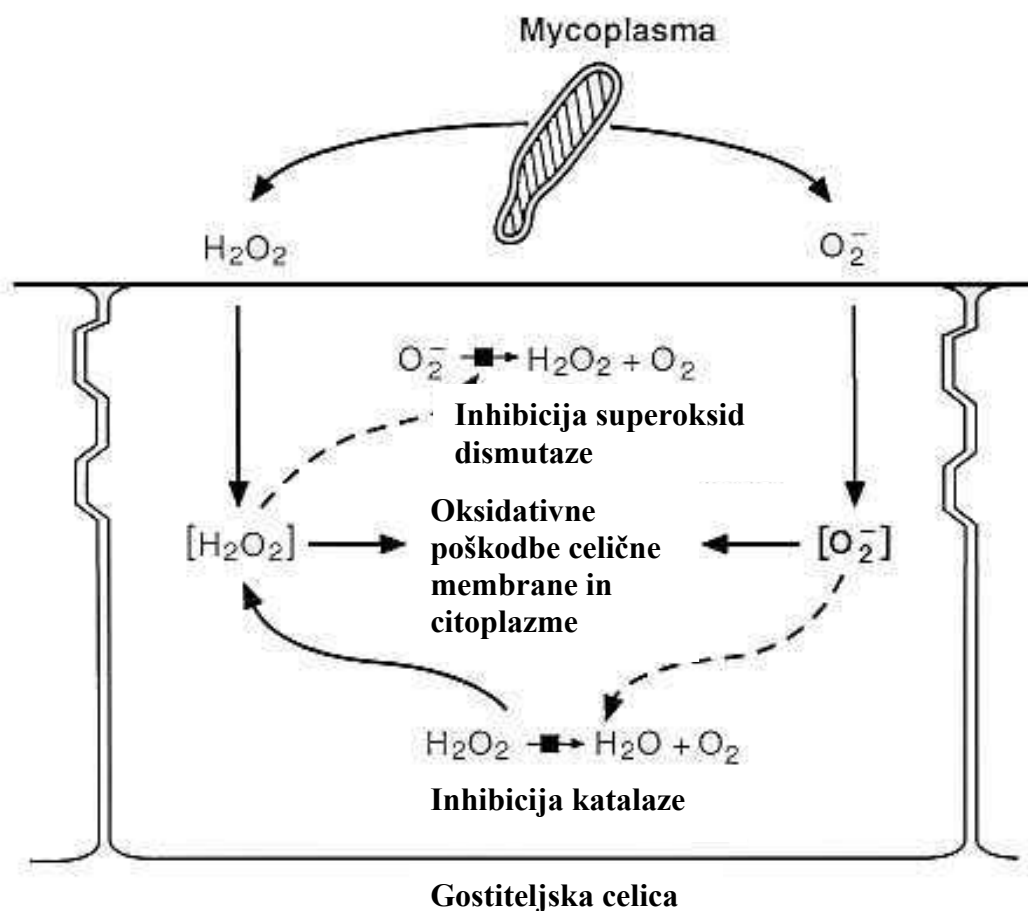
Björnelius in sod. so pri bolniku z unilateralnim kojuktivitisom z metodo PCR dokazali DNK *M. genitalium* tako v prvem jutranjem urinu, kot tudi v vzorcu očesne veznice. Sekvence pomnožkov z začetnimi oligonukleotidi MgPa-1 in MgPa-3 so bile v obeh vzorcih identične, kar kaže na avtoinfekcijo (Björnelius in sod., 2004).

2.8 PATOGENEZA OKUŽB Z BAKTERIJO *M. genitalium*

Mikoplazme so obvezni paraziti, ki živijo v pretežno nespreminjajočem se okolju (Glass in sod., 2005). Sposobne so vdreti v človeške tarčne celice in se znotraj njih razmnoževati daljše časovno obdobje (Baseman in sod., 1995; Dallo in sod., 2000). Mikoplazme so prilagojene na parazitski način življenja, ker niso sposobne sinteze sterolov in številnih biosintetskih prekurzorjev, kot so aminokisline, nukleotidi in maščobne kisline (Blaylock in sod., 2004).

V patogenezi okužbe z *M. genitalium* je pomembna pritrditev bakterije na gostiteljske celice s pomočjo koničaste strukture z adhezini in pomožnimi citoadherentni beljakovinami (Baseman in sod., 1995; Krause, 1998). Le redko povzročijo smrt svojega gostitelja, bolj so nagnjene k povzročanju kroničnih obolenj. Primarno so mikoplazme površinski paraziti epitelijskih celic sluznice. Običajno izražajo tropizem za gostitelja in celice. Primarno mesto okužbe z bakterijo *M. genitalium* je urogenitalni trakt. O specifičnosti okužbe posameznih urogenitalnih celičnih tipov ni dosti znanega, vendar so ugotovili, da aderenza *M. genitalium in vitro* ni omejena le na epitelijske celice (Jensen, 2006).

Mikoplazme povzročajo tkivne poškodbe, kar je delno posledica delovanja bakterijskih toksinov in škodljivih metabolitov, kot so vodikov peroksid in superoksidni metaboliti (Lind in sod., 1984). Vodikov peroksid povzroči oksidativne poškodbe celične membrane in citoplazme gostiteljskih celic, medtem ko superoksidni radikali inhibirajo katalazo gostiteljske celice, kar dodatno vpliva na kopičenje vodikovega peroksida (Razin, 1996). (Mehanizem oksidativnih poškodb mikoplazem na gostiteljske celice prikazuje slika 12).



Slika 12: Mehanizem oksidativnih poškodb mikoplazem na gostiteljske celice (Razin, 1996).

Pri okužbi z *M. genitalium* naj bi nastale tkivne poškodbe predvsem zaradi gostiteljevega celičnega odziva (Fernald in sod., 1975) podobno kot pri okužbah z *M. pneumoniae* (Jensen, 2006). Znano je, da mikoplazme vplivajo na aktivacijo makrofagov in stimulirajo tvorbo citokinov (Rottem, 2003). Za večino mikoplazem indukcija citokinov predstavlja glavni mehanizem virulence. Inducirani citokini imajo številne vplive na eukariotske gostiteljske celice in so pomembni mediatorji tkivne patologije (Razin, 1996).

Nekateri delci mikoplazem lahko delujejo kot superantigeni in tako lahko povzročajo tudi avtoimune bolezni (Rottem, 2003). Mikoplazme se s spreminjanjem površinskih beljakovin lahko izognejo imunskemu odzivu gostitelja (Razin, 1996).

Patogeneza bakterije *M. genitalium* je bila v preteklih letih dobro preučevana in nove molekularne metode bodo prispevale k še boljšemu poznavanju patogenih dejavnikov te bakterije. V prihodnjosti je potrebnih več raziskav o povezanost med *in vitro* ter *in vivo* okužbami z *M. genitalium*, več pozornosti pa je potrebno nameniti tudi gostiteljskim faktorjem (Jensen, 2006).

2.9 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA

V laboratorijski diagnostiki infekcijskih bolezni uporabljamo dva različna pristopa. Prvi je neposredno dokazovanje povzročitelja bolezni z mikroskopijo, osamitvijo povzročitelja, dokazom povzročiteljevih antigenov, ali z dokazom prisotnosti nukleinske kisline povzročitelja. Z drugim, posrednim pristopom, dokazujemo protitelesa proti povzročitelju, ki nastanejo kot odgovor imunskega sistema na okužbo (Jensen, 2006).

Za dokaz okužbe z *M. genitalium* je zelo pomembna pravilna izbira in odvzem bolnikove kužnine (Jensen, 2006). Jensen in sod. so ugotovili, da je koncentracija DNK *M. genitalium* v urogenitalih vzorcih bolnikov zelo nizka (Jensen in sod., 2004b).

Pri določanju najprimernejše kužnine za dokaz DNK bakterije *M. genitalium*, so primerjali vzorce prvega jutranjega urina, brise sečnice, ter brise materničnega vratu (Jensen in sod., 2004c). Ugotovili so, da je pri moških primernejša kužnina prvi jutranji urin, saj so v 97,6 % teh vzorcev uspešno dokazali DNK *M. genitalium*. Pri ženskah so v vzorcih prvega jutranjega urina uspešno dokazali DNK *M. genitalium* le v 88 %. Pregledali so še brise materničnega vratu in ugotovili, da s testiranjem obeh vrst vzorcev pri ženskah lahko dokažejo okužbo z *M. genitalium* v 96 %. Opazili so tudi, da so bili vzorci urina pri pacientkah manj stabilni kot vzorci moškega urina. Še vedno ni pojasnjen razlog za razliko v stabilnosti urina pri moških in ženskah. Preiskava kliničnih vzorcev je tako pokazala, da so vzorci prvega jutranjega urina pri moških zelo dobri vzorci za diagnostiko *M. genitalium*, medtem ko so pri ženskah primernejši brisi materničnega vratu (Jensen in sod., 2004c).

2.9.1 Osamitev bakterije *M. genitalium* iz kužnine

Bakterijo *M. genitalium* je prvič leta 1981 opisal Tully s sodelavci (Tully in sod., 1981). *M. genitalium* zelo težko osamimo iz bolnikove kužnine. Gojimo jo v posebnih selektivnih in obogatenih gojiščih (Jensen in sod., 1996; Tully in sod., 1981). Podobno kot ostale mikoplazme, za uspešno rast tudi *M. genitalium* potrebuje posebno gojišče, ki je obogateno z serumom - ta vsebuje sterole, kvasni ekstrakt, glukozo, pH indikator in penicilin, ki zavira rast kontaminirajoče flore. Mikoplazme za rast potrebujejo še številne rastne faktorje, kot so purini, pirimidini, aminokisline in vitamini (Murray in sod., 2005).

Leta 2004 so Baseman in sod. objavili študijo o izolaciji bakterije *M. genitalium* iz brisov nožnice in materničnega vratu 31 žensk od 838, ki so bile vključene v raziskavo. Bakterije so gojili v gojišču imenovanem SP4 z dodatkom 0,25 mg/ml ciprofloksacina, ki naj bi preprečeval rast kontaminirajočih bakterij. Rast bakterij *M. genitalium* so opazili že po 14 - 20 dnevih, kar je hitreje, kot je bilo potrebno za izolacijo originalnega seva G-37, ki je za rast potreboval več kot 50 dni. Vzorce, pri katerih so izolirali *M. genitalium* so testirali tudi z metodo PCR in zanimivo je, da je bilo s to metodo le 12 (39 %) vzorcev pozitivnih na *M. genitalium*. Nizka občutljivost metode PCR je bila najbrž posledica premajhne količine genetskega materiala v vzorcu ali pa prisotnost inhibitorjev reakcije PCR (Baseman in sod., 2004).

Jensen in sod. so poskušali gojiti *M. genitalium* tudi v celičnih kulturah, saj je znano, da so le-te dovzetne za okužbe z različnimi vrstami mikoplazem. Uporabili so celice Vero, HeLa, McCoy in HL. Ta pristop se je izkazal za zelo učinkovitega, vendar časovno precej dolgotrajnega. Novo odkriti sevi so za rast v celični kulturi potrebovali več kot šest mesecev (Jensen in sod., 1996).

2.9.2 Metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR)

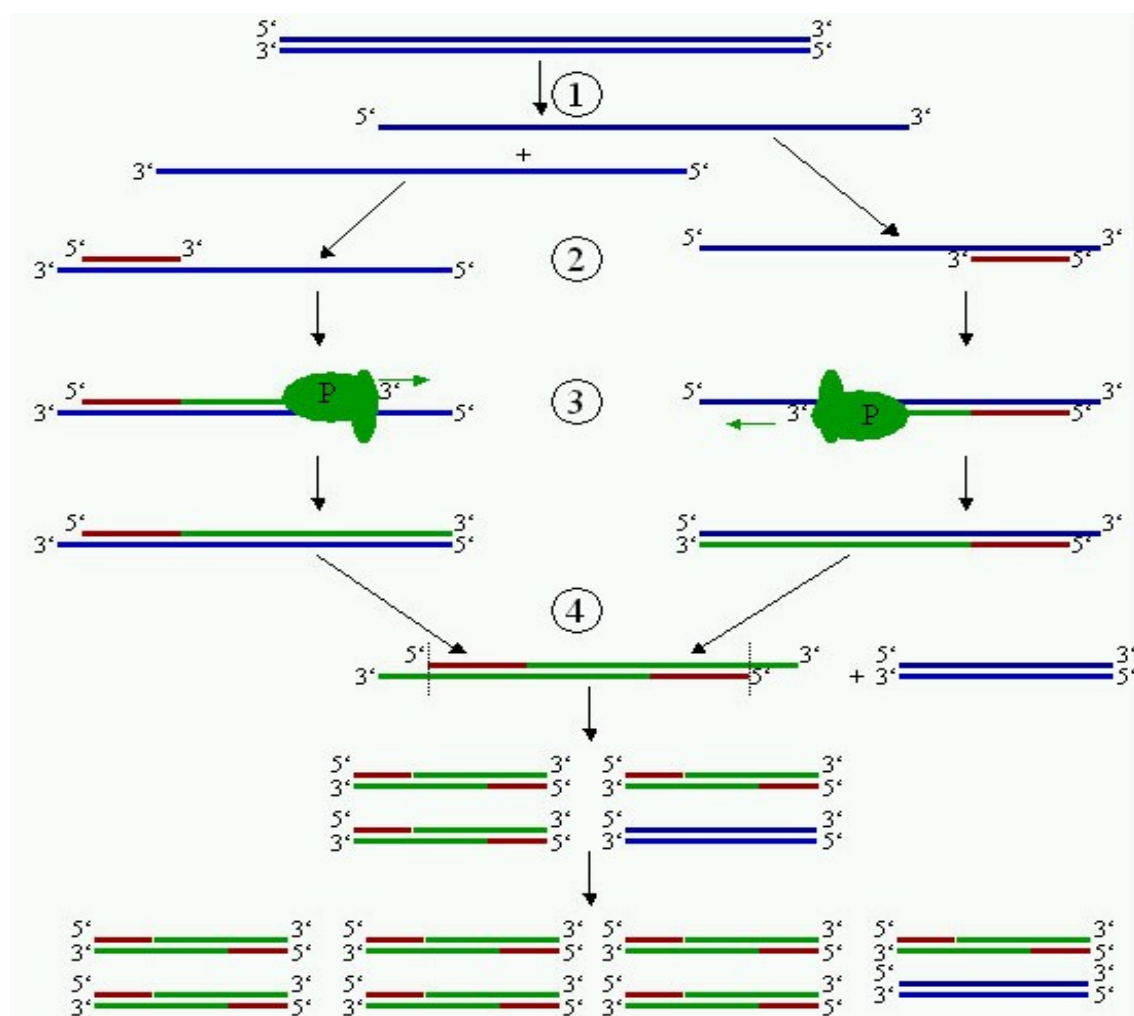
Laboratorijska diagnostika okužb z *M. genitalium* danes temelji predvsem na molekularnih testih (Baseman in sod., 2004; Jensen in sod., 2003; Svenstrup in sod., 2005). Različice PCR testov so proti koncu osemdesetih let izboljšale zmožnosti klinične diagnostike *M. genitalium* (Jensen in sod., 1991). Detekcija *M. genitalium* z uporabo PCR ne zahteva živih bakterij, potrebna je le njihova DNK (Hardick in sod., 2006).

Poleg uspešne detekcije *M. genitalium* v urinskih in urogenitalnih vzorcih s pomočjo PCR, poročajo tudi o uspešnem dokazu bakterije v rektalnih brisih, sklepni tekočini, vzorcih respiratornega trakta (Jensen in sod., 2004a), ter očesne veznice (Björnelius in sod., 2004). Ugotovili pa so, da je zelo nizka koncentracija DNA bakterije *M. genitalium* v urogenitalih vzorcih pacientov (Jensen in sod., 2004b).

PCR testi (potek verižne reakcije s polimerazo prikazuje slika 13), ki so trenutno v uporabi temeljijo na dokazu pridelkov PCR z elektroforezo v agaroznem gelu (Totten in sod., 2001), naknadno pa lahko te produkte dokažemo tudi s pomočjo hibridizacije s specifičnimi sondami, specifičnimi za produkte PCR *M. genitalium*, s sekveniranjem teh produktov (Yoshida in sod., 2002b), ali pa izvedemo PCR v realnem času (Yoshida in sod., 2002a).

Prvi test za dokaz DNK *M. genitalium*, ki je slonel na metodi PCR je leta 1991 objavila skupina danskih raziskovalcev, pod vodstvom Jørgen Skov Jensen-a (Jensen in sod., 1991). Še istega leta so tudi Palmer in sod. objavili svoje različice testa PCR (Palmer in sod., 1991). Na začetku so menili, da je adhezinski gen *MgPa* precej konzervativne narave, saj ima pomembno vlogo v patogenezi okužb, zato so za pomnoževanje nukleinske kisline uporabili sekvenco gena *MgPa* (Jensen in sod., 1991; Palmer in sod., 1991). Kasneje so ugotovili, da ima gen *MgPa* variabilne regije (Jensen in sod., 1991). Uporaba gena *MgPa* kot tarčne DNK v testu PCR je lahko zaradi variabilnosti tega gena neprimerna, saj se možnost nastanka lažno negativnih rezultatov poveča, če je mutacija prisotna v enem od vezavnih mest začetnega oligonukleotida (Jensen, 2006). Danes se za tarčno DNK najpogosteje uporablja gen za 16S rRNK. Genska sekvenca 16S rRNK je najprimernejša,

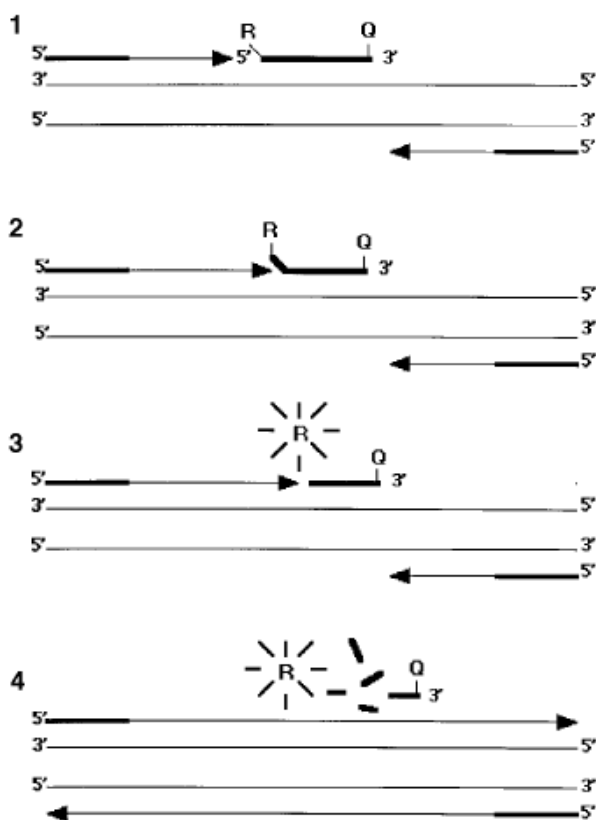
saj je relativno stabilna in vsebuje malo polimorfizmov znotraj populacije *M. genitalium* (Eastick in sod., 2003).



Slika 13: Shematski prikaz polimerazne verižne reakcije. (1) Denaturacija pri 94-96 °C. (2) Prileganje oligonukleotidnih začetnikov pri 68 °C. (3) Podaljševanje verig DNK pri 72 °C (P = Polimeraza). (4) Prvi cikel je končan. Pridobljeni dve DNK verigi služita kot šablona za naslednji cikel, pri katerem se količina DNK podvoji, tako kot v vsakem nadaljnjem ciklu (George, 2008).

2.9.3 Metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času

Prvo uporabo PCR v realnem času so leta 2002 prikazali Yoshida in sod. (Yoshida in sod., 2002a). Metoda PCR v realnem času (potek PCR v realnem času prikazuje slika 14) je izboljšala dokazovanje DNK bakterije *M. genitalium* v kliničnih vzorcih. Ta metoda vključuje sočasno pomnoževanje in detekcijo specifičnega odseka nukleinske kisline, za kar je potreben krajši čas, poleg tega pa s to metodo dosežemo tudi višjo občutljivost in specifičnost (Hardick in sod., 2006). Poglavitna prednost te metode je dokaz pridelkov reakcije PCR v zaprtem sistemu, zaradi česar je možnost kontaminacije pridelkov PCR znižana. Metoda PCR v realnem času na osnovi sond zagotavlja dodatno specifičnost testa, poleg tega pa se izognemo tudi subjektivni interpretaciji rezultatov z etidijevim bromidom obarvanega agaroznega gela. Danes diagnostika okužb z bakterijo *M. genitalium* zaradi visoke specifičnosti in občutljivosti temelji predvsem na metodi PCR v realnem času (Jensen, 2006).



Slika 14: Kvantitativni PCR v realnem času. (1) Reakcija poteka podobno kot osnovna verižna reakcija s polimerazo (PCR), le da se znotraj sekvence gena med začetnimi oligonukleotidi veže še proba z dvema

fluorescentnima barviloma. (2) Ko polimeraza podaljšuje začetna oligonukleotida, se proba sprosti iz verige DNK. (3) Nukleazna aktivnost polimeraze cepi barvilo iz probe. (4) Po ločitvi barvila od utiševalca, pride do nastanka fluorescenčnega signala (Grove, 1999)

2.9.3.1 Več tarčni PCR v realnem času

Predstavlja alternativno rešitev problema neskladnih rezultatov različnih testov. Več tarčni PCR v realnem času omogoča sočasno pomnoževanje različnih tarčnih genov, kar omogoča samopotrditev rezultatov in zmanjša, oziroma odpravi potrebo po uporabi različnih potrditvenih testov (Hardick in sod., 2006).

3 MATERIAL IN METODE

V naši raziskavi smo uporabili 88 vzorcev. Vzorci so bili brisi sečnice 62 moških in brisi sečnice ter materničnega vratu 24 žensk (dva vzorca smo testirali dvakrat). Naredili smo PCR, kasneje pa so v Laboratoriju za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami naredili tudi PCR v realnem času in mi dovolili primerjati rezultate.

3.1 ZBIRANJE IN SHRANJEVANJE KUŽNINE

Iz Dermatovenerološke klinike in Infekcijske klinike v Ljubljani smo pridobili brise sečnice in brise materničnega vratu bolnikov z urogenitalno okužbo (63 brisov sečnice 62 moških in 25 brisov sečnice ter materničnega vratu 24 žensk). Pri 1 moškem in 1 ženski sta bila odvzeta 2 brisa, vsak v svojem gojišču (vzorci so navedeni v preglednici 3). Brise smo do testiranja hranili v transportnem gojišču za urogenitalne bakterije (UMMT, International Microbio, Francija) in v transportnem gojišču za klamidije 2SP (0,2 M glukoza, 0,02 M fosfatni pufer pH 7 in 10 % fetalni telečji serum) pri -70 °C.

Preglednica 3: Preglednica vzorcev

	Kužnine v gojišču 2SP	Kužnine v gojišču UMMT	Skupaj
Brisi sečnice moških	43	20	63
Brisi materničnega vratu in sečnice	21	4	25
Skupaj	64	24	88

1) Sprva smo uporabili 24 vzorcev v gojišču UMMT. Moških vzorcev brisa sečnice je bilo 20, ženski vzorci brisov materničnega vratu in sečnice pa so bili 4. Testirali smo jih z metodo PCR (komplet reagentov italijanskega proizvajalca). Kasneje so jih v Laboratoriju za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami testirali tudi z metodo PCR v realnem času.

2) Nato smo uporabili 64 vzorcev v transportnem gojiču za klamidije (2SP), med katerimi sta bila vzorca dveh pacientov, ki smo jih že obdelali iz gojišča za urogenitalne bakterije (UMMT). Moških vzorcev brisa sečnice je bilo 43, ženskih vzorcev brisa sečnice in materničnega vratu pa je bilo 21. Vzorce smo testirali z metodo PCR, s kompleti reagentov različnih proizvajalcev (italijanskega in nemškega). Te vzorce so kasneje v Laboratoriju za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami testirali tudi z metodo PCR v realnem času.

3.2 OSAMITEV BAKTERIJSKE DNK

Postopek izolacije genomske DNK iz dobljenih brisov smo izvajali v zaščitni komori LFV91T (Iskra PIO d.o.o., Slovenija). Pri tem smo uporabljali rokavice in aseptično tehniko dela. Na ta način smo zmanjšali možnost kontaminacije vzorcev med osamitvijo DNK.

Osamitev DNK smo izvedli na dva načina:

- s kompletom reagentov DNA-Sorb-A (Sacace Biotechnologies Srl, Italija), po opisanem protokolu za osamitev DNK iz brisov urogenitalnega trakta. Sledili smo navodilom proizvajalca.
- s kompletom reagentov QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Nemčija), po opisanem protokolu za osamitev iz krvi in drugih telesnih tekočin (angl. Blood and Body Fluid Spin Protocol). Tudi tu smo sledili navodilom proizvajalca.

Vzorce brisov smo predhodno odmrznili pri sobni temperaturi.

1) IZOLACIJA DNK S KOMPLETOM REAGENTOV DNA-SORB-A

(Sacace Biotechnologies Srl, Italija)

Oprema in reagenti:

- biološki kabinet
- centrifuga Centrifuge 5403 (Eppendorf, Nemčija)
- toplotni stresalnik mikrotubic Thermomixer 5436 (Eppendorf, Nemčija)
- stresalnik
- avtomatske pipete (Eppendorf)
- sterilni nastavki za pipete (Eppendorf)
- sterilne mikrotubice (1,5 ml)
- stojalo za mikrotubice (Eppendorf)
- lizirajoča raztopina (angl. Lysis Solution)
- raztopina za spiranje (angl. Washing Solution)
- "Sorbent"
- DNK-eluent

V 1,5 ml tubice smo prenesli 10 μ l interne kontole, 300 μ l lizirajoče raztopine in 100 μ l kužnine. V tem koraku smo pripravili tudi negativno kontrolo, ki je vsebovala 10 μ l interne kontrole, 300 μ l lizirajoče raztopine in 100 μ l destilirane vode. Tubice smo premešali z vorteksiranjem (15 s) in inkubirali 5 min pri 65 °C. Bakterijske celice so lizirale. Po inkubaciji smo tubice centrifugirali 5 min pri 14000 obratih/minuto.

Supernatant smo prenesli v nove tubice.

"Sorbent" smo pred uporabo močno premešali. V vsako tubico smo prenesli 20 μ l "Sorbenta", ki je vezal DNK.

Tubice smo temeljito premešali z vorteksiranjem (5- 7 s), nato pa inkubirali 3 min pri sobni temperaturi. Ta korak smo ponovili.

Po centrifugiranju tubic 1 min pri 8000 obratih/minuto, smo iz vsake tubice zavrgli supernatant.

Sedimentu, v katerem je bil "Sorbent" z DNK, smo dodali 500 μ l raztopine za spiranje. Mešanico smo dobro premešali z vorteksiranjem in jo centrifugirali 1 min pri 10000 obratih/

minuto. Supernatant smo zavrgli. Sedimentu smo zopet dodali 500 µl raztopine za spiranje, dobro premešali, centrifugirali 1 min pri 10000 obratih/minuto ter supernatant ponovno zavrgli. Tako smo odstranili beljakovine, maščobe in inhibitorje reakcije PCR. Odprte tubice smo inkubirali 5-10 min pri 65 °C.

Sedimentu smo dodali 100 µl puferske raztopine za eluiranje DNK in dobro premešali. Mešanico smo inkubirali 5 min pri 65° C na stresalniku.

Sledilo je ponovno centrifugiranje 1 min pri 12000 obratih/minuto.

Supernatant z izolirano DNK smo prenesli v nove tubice, ki smo jih do nadaljne obdelave hranili pri 4 °C.

2) IZOLACIJA DNK S KOMPLETOM REAGENTOV QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Nemčija)

Oprema in reagenti:

- toplotni stresalnik mikrotubic Thermomixer 5436 (Eppendorf, Nemčija)
- centrifuga Centrifuge 5403 (Eppendorf, Nemčija)
- stresalnik
- avtomatske pipete (Eppendorf)
- sterilni nastavki za pipete (Eppendorf)
- stojalo za mikrotubice (Eppendorf)
- sterilne mikrotubice (1,5 ml)
- mikrokolone (QIAamp Spin Column, priložene kitu) z 2 ml zbiralnimi epruvetami
- pufer AL (angl. Lysis Buffer) lizirajoči pufer
- pufer AW1 (angl. Wash Buffer 1) spiralni pufer
- pufer AW2 (angl. Wash Buffer 2) spiralni pufer
- pufer AE (angl. Elution Buffer) elucijski pufer
- proteinaza K
- etanol (96-100 %)

V 1,5 ml tubico smo prenesli 600 µl kužnine (brisi sečnice in brisi materničnega vratu v transportnem gojišču 2SP). Nato smo vsebino centrifugirali 30 minut pri 15000 obratih/minuto. Po končanem centrifugiranju smo zavrgli 400 µl supernatanta, 200 µl preostale kužnine pa smo uporabili za izolacijo DNK po protokolu za osamitev iz krvi in drugih telesnih tekočin (angl. Blood and Body Fluid Spin Protocol). V tem koraku smo pripravili tudi negativno kontrolo, ki je vsebovala 200 µl sterilne destilirane vode.

V vsako tubico smo prenesli 200 µl pufru AL in mešanico premešali z vorteksiranjem (15 s). Tubice smo centrifugirali 1-2 sekundi, da smo odstranili kapljice iz notranjih sten.

Kužnini smo dodali 20 µl proteinaze K, mešanico dobro premešali z vorteksiranjem in jo inkubirali 10 min pri 56 °C.

V naslednjem koraku smo mešanici dodali 200 µl etanola (96 - 100 %) in dobro premešali z vorteksiranjem, ter s kratkim centrifugiranjem odstranili kapljice iz notranjih sten tubic.

Lizat smo previdno prenesli v mikrokolono (QIAamp Spin Column) vloženo v 2 ml zbiralno tubico. Nato smo 1 minuto centrifugirali pri 8000 obratih/minuto. Izpirek (eluat) in zbiralno tubico smo zavrgli, mikrokolono z vezano DNK pa prenesli v novo zbiralno tubico.

V mikrokolono smo dodali 500 µl spiralnega pufru AW1. Sledilo je ponovno centrifugiranje 1 minuto pri 8000 obratih/minuto. Izpirek in zbiralno tubico smo ponovno zavrgli in mikrokolono prestavili v novo zbiralno tubico.

V naslednjem koraku smo dodali 500 µl spiralnega pufru AW2 in centrifugirali 3 minute pri 14000 obratih/minuto.

Zopet smo zavrgli izpirek in zbiralno tubico, mikrokolono pa prenesli v sterilno 1,5 ml tubico in dodali 60 µl elucijskega pufru AE. Vzorec smo inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. Izolirano DNK *M. genitalium* smo eluirali iz membrane kolone s

centrifugiranjem 1 minuto pri 8000 obratih/minuto. Mikrokolono smo zavrgli, izolirano DNK pa smo do nadaljnje obdelave hranili pri -20 °C.

3.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Posamezne faze reakcije PCR smo izvajali v ločenih prostorih. Tako smo zmanjšali možnost kontaminacije vzorcev in prostora. Pripravo reakcijske mešanice smo izvajali v zaščitni komori (Iskra PIO LFT 91T) pod sterilnimi pogoji. Pipet in drugega potrošnega materiala nismo prenašali v druge prostore, prav tako smo oboje uporabljali le za določen korak. Reagente za PCR smo shranjevali v majhnih količinah. Pri pripravi DNK in mešanice za PCR smo poleg vzorcev vedno vključili še negativne kontrole.

Za pomnoževanje izolirane DNK *M. genitalium* z metodo PCR, smo uporabili dva različna kompleta reagentov:

- *Mycoplasma genitalium* 280/550 IC (Sacace Biotechnologies Srl, Italija)
- *Mycoplasma genitalium* (Genekam Biotechnology AG, Nemčija)

Za uspešno izvedeno metodo PCR morajo biti v reakcijski mešanici ustrezne koncentracije začetih oligonukleotidov, polimeraze Taq, deoksiribonukleotidov (dNTP), MgCl₂, pufru in tarčne DNK. V našem primeru so bile omenjene sestavine v ustreznih koncentracijah že pripravljene v kompletih reagentov za pomnoževanje DNK.

Za pravilno izvedbo metod smo sledili navodilom proizvajalcev.

3.3.1 Pomnoževanje DNK s kompletom reagentov *Mycoplasma genitalium* 280/550 IC (Sacace Biotechnologies Srl, Italija)

Oprema in reagenti:

- mikrotubice PCR-mix-1 (0,2 ml)
- PCR-mix-2 (0,6 ml)
- mineralno olje (2,0 ml)

- pozitivna kontrola C+ (0,2 ml)
- negativna kontrola C- (0,2 ml)
- interna kontrola IC (1,0 ml)
- pufer DNK (0,5 ml)
- sterilni nastavki za pipete s filtrom
- pipete
- termični pomnoževalnik PE 9600 (PE Applied Biosystems, ZDA)

Vse reagente smo hranili pri 2-8 °C.

V 0,2 ml tubice PCR-mix-1 smo prenesli 10 µl reakcijske mešanice PCR-mix-2 in 10 µl izolirane DNK. Negativna kontrola je vsebovala 10 µl reakcijske mešanice PCR-mix-2 in 10 µl destilirane vode, ki smo jo uporabili kot negativno kontrolo pri izolaciji DNK. V 0,2 ml tubico PCR-mix-1 za pozitivno kontrolo smo poleg 10 µl reakcijske mešanice PCR-mix-2 dodali še pozitivno kontrolo, ki je bila priložena kompletu reagentov. Vsaki tubici smo dodali 20 µl mineralnega olja, tako da je bil celotni volumen reakcijske mešanice za PCR 40 µl.

Pomnoževanje 280 baznih parov dolgega zaporedja DNK smo izvedli v termičnem pomnoževalniku PE 9600 z 42-kratno ponovitvijo temperaturnega ciklusa PCR sestavljenega iz treh zaporednih inkubacij:

- 1) 2 minuti: 95 °C
- 2) 1 minuta: 95 °C- denaturacija
1 minuta: 61 °C- naleganje
1 minuta: 72 °C- podaljševanje } 42 - krat
- 3) 1 minuta: 72 °C

Po končani reakciji PCR smo pomnoženo DNK ohladili pri 4 °C.

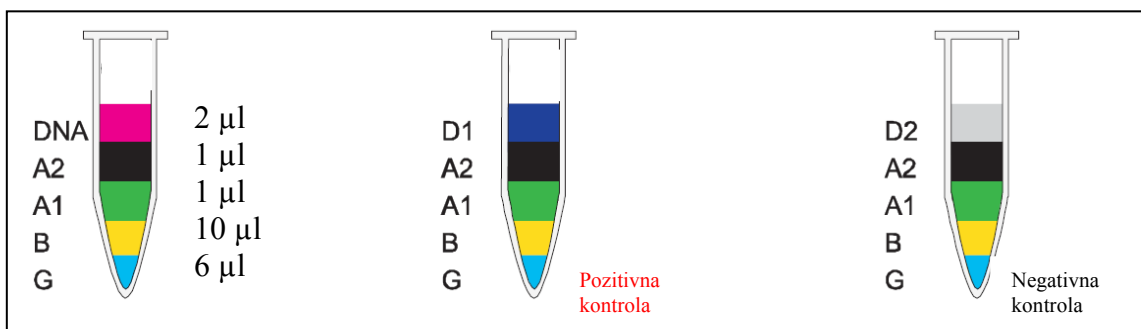
3.3.2 Pomnoževanje DNK s kompletom reagentov *Mycoplasma genitalium* (Genekam Biotechnology AG, Nemčija)

Oprema in reagenti:

- mikrotubice (0,2 ml)
- reagent A1 in A2
- reagent B
- reagent G
- pozitivna kontrola (tubica D1)
- negativna kontrola (tubica D2)
- označevalec molekulske mase (tubica E)
- barvilo (tubica F)
- centrifuga
- pipete
- sterilni nastavki za pipete z in brez filtra (20 μ l, 5 μ l in 1 μ l)
- termični pomnoževalnik PE 9600 (PE Applied Biosystems, ZDA)

Do uporabe smo reagente shranili pri -20 °C.

Reakcijska mešanica za pomnoževanje z oligonukleotidnimi začetniki, specifičnimi za *M. genitalium* je vsebovala reagente G, B, A2 in A1, katerim smo na koncu dodali še 2 μ l izolirane DNK. Negativno kontrolo smo pripravili tako, da smo namesto osamljene DNK reakcijski mešanici dodali še reagent D2, pozitivni kontroli pa smo dodali reagent D1. Skupni volumen reakcijske mešanice je znašal 20 μ l (sestava reakcijske mešanice je prikazana na sliki 15).



Slika 15: Reakcijska mešanica za reakcijo PCR

Pomnoževanje 507 baznih parov dolgega zaporedja DNK smo izvedli v termičnem pomnoževalniku PE 9600 s 30-kratno ponovitvijo temperaturnega ciklusa PCR sestavljenega iz treh zaporednih inkubacij:

- 1) 5 minut: 94 °C
 - 2) 30 sekund: 94 °C- denaturacija
 - 30 sekund: 55 °C- naleganje
 - 90 sekund: 72 °C- podaljševanje
- } 30 krat
- 3) 5 minut: 72 °C

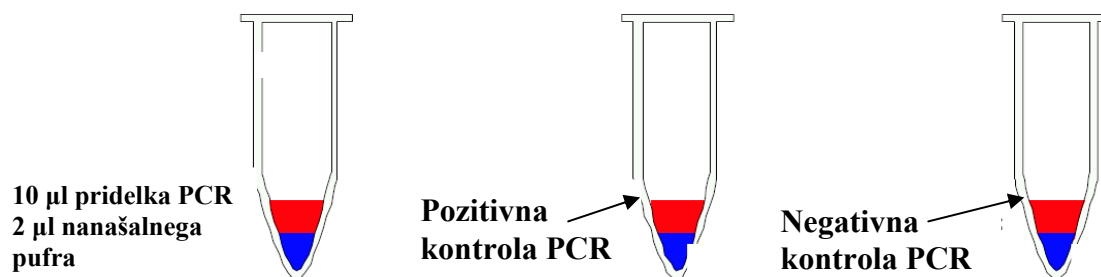
Dobljene pridelke PCR smo do nadaljnje obdelave shranili pri 4 °C.

3.3.3 Dokazovanje pridelkov reakcije PCR

Pridelke PCR smo ločevali z vodoravno elektroforezo (HE33 mini horizontal submarine unit Hoefer™, Nemčija) v 2 % agaroznem gelu. V ta namen smo uporabili NuSieve 3:1 (BioZym, ZDA) agarozo v prahu, ki smo jo raztopili v pufru TAE 1:10 (0,04 M Tris-HCl, 0,02 M NaCl, 2 mM EDTA, 0,02 M Na-acetat pH 8,3). Pripravljeno raztopino smo v erlenmajerici premešali, pokrili s pokrovčkom in v mikrovalovni pečici segreli do vrelišča. Nekaj sekund smo pustil vreti, nato pa smo preverili, če se je agarosa v celoti raztopila. Pod tekočo vodo smo erlenmajerico z agarozo ohladili do približno 40 °C. Nato smo dodali 4,5 µl etidijevega bromida (Sigma, ZDA, 10 mg/ml) in gel nalili v že pripravljen in kalibriran kalup z glavničkom.

V vdolbinice elektroforeznega gela smo nanegli po 10 µl pridelka PCR in 2 µl nanašalnega pufra (15 % Ficoll 400, 0,35 % bromofenolno modrilo) oziroma barvilo F pri kompletu reagentov *Mycoplasma genitalium* (Genekam Biotechnology AG, Nemčija) (priprava PCR pridelkov in nanašalnega pufra oziroma barvila je prikazana na sliki 16). V prvo vdolbinico smo nanegli označevalec molekulske mase, ki vsebuje odseke DNK v velikosti mnogokratnika 123 baznih parov (*Mycoplasma genitalium*; Sacace Biotechnologies Srl, Italija) in označevalec molekulske mase, ki vsebuje odseke DNK v velikosti

mnogokratnika 100 baznih parov. V naslednje vdolbinice smo nanegli pridelke naše reakcije PCR, v zadnji dve vdolbinici pa negativno in pozitivno kontrolo.



Slika 16: Priprava PCR pridelkov in nanašalnega pufra za gelsko elektroforezo

Elektroforeza je potekala 60 minut pri sobni temperaturi v električnem polju pri 100 Voltih. Po končani elektroforezi smo gele pregledovali v transluminatorju LKB Macro Vue (Pharmacia, Švedska) z valovno dolžino 302 nm in jih fotografirali s polaroidno kamero Polaroid DS 34 (direct screen instant camera, Polaroid, ZDA).

Velikost pridelkov reakcije PCR smo določili s primerjavo njihove lege prog glede na proge DNK označevalca molekulske mase znane velikosti in glede na pozitivno kontrolo.

S kompletom reagentov *Mycoplasma genitalium* 280/550 IC (Sacace Biotechnologies Srl, Italija) smo v reakciji PCR pomnoževali 280 bp odseke mikoplazmalne DNK in interno kontrolo velikosti 550 baznih parov.

Interpretacija pozitivnega rezultata:

- Vidna proga tarčne DNK *M. genitalium* v velikosti 280 bp in navzoča proga interne kontrole v velikosti 550 bp
- Vidna proga tarčne DNK *M. genitalium* brez vidne proge interne kontrole

Pri uporabi kompleta reagentov *Mycoplasma genitalium* (Genekam Biotechnology AG, Nemčija) pa smo s PCR pomnožili 507 bp dolge odseke DNK *M. genitalium*.

3.4 PCR V REALNEM ČASU

V laboratoriju za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami so v istih kužninah dokazovali DNK *M. genitalium* še z metodo PCR v realnem času po postopku, ki ga je opisal Svenstrup s sod. (2005) z manjšo modifikacijo. Z metodo PCR v realnem času so pomnoževali za *M. genitalium* specifični odsek gena *gap*, ki kodira sintezo encima gliceraldehid-3-fosfat. Pri tem so uporabili komplet reagentov LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche, ZDA), visoko specifična začetna oligonukleotida mg-gap-605f, mg-gap-794r in sonde mg-gap-669FL in mg-gap-700LC. V test PCR so vključili še interno kontrolo za dokazovanje navzočnosti inhibitorjev reakcije PCR. V ta namen so pomnoževali odsek DNK za humani beta globin.

Pripravljeno reakcijsko mešanico so razdelili po 15 µL v ustrezne kapilare. Dodali so 5 µL izolirane DNA. Skupni volumen je tako znašal 20 µL. PCR v realnem času so izvedli na aparaturi LightCycler® 2,0 (Roche, ZDA).

Po končani reakciji so pri vzorcih, kjer se je pomnoževala DNK bakterije *M. genitalium*, opazili razločen porast fluorescenčne krivulje.

Dobljene rezultate so mi dovolili primerjati z rezultati metode PCR.

4 REZULTATI

Za izvedbo naloge smo iz Dermatovenerološke klinike in Infekcijske klinike v Ljubljani pridobili 63 brisov sečnice 62 pacientov in 25 brisov sečnice ter materničnega vratu 24 pacientk z uretritisom (vzorci so navedeni v preglednici 3).

4.1 DOKAZOVANJE DNK *M. genitalium* Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO

Za dokazovanje DNK *M. genitalium* z metodo PCR smo uporabili komplet reagentov italijanskega proizvajalca Mycoplasma genitalium 280/550 IC (Sacace Biotechnologies Srl, Italija) in komplet reagentov nemškega proizvajalca Mycoplasma genitalium (Genekam Biotechnology AG, Nemčija). Z reagenti Mycoplasma genitalium 280/550 IC (Sacace Biotechnologies Srl, Italija) smo z metodo PCR dobili pomnožen fragment DNK *M. genitalium* velikosti 280 bp, z reagenti Mycoplasma genitalium (Genekam Biotechnology AG, Nemčija) pa smo dobili pomnožen fragment DNK *M. genitalium* velikosti 507 bp. Velikost pridelkov smo določali glede na velikost DNK označevalca molekulske mase in glede na pozitivno kontrolo.

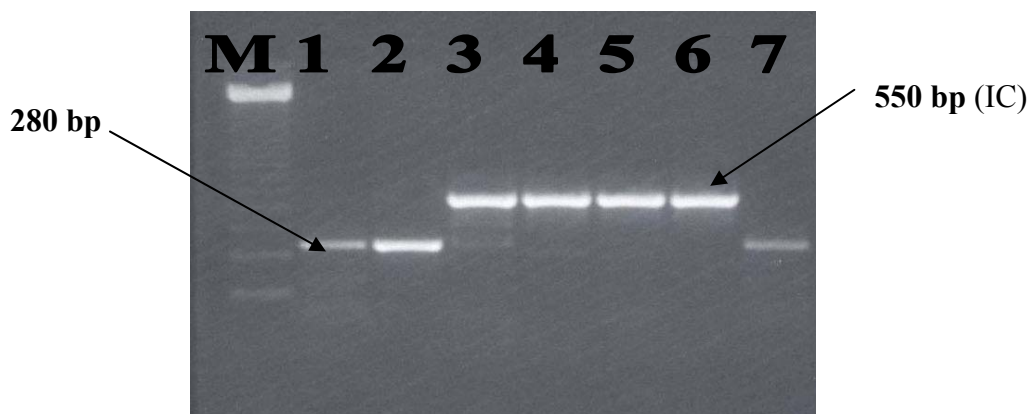
Preglednica 4: Rezultati dokazovanja okužb z *Mycoplasma genitalium* z metodo PCR in z metodo PCR v realnem času.

METODA	Št. vzorcev	Št. pozitivnih vzorcev	Vzorci
Mycoplasma genitalium 280/550 IC (Sacace Biotechnologies Srl, Italija)	88	2	B ⁺ , C ⁺
Mycoplasma genitalium (Genekam Biotechnology AG, Nemčija)	64	1	B ⁺ , C ⁻
Real time PCR ("in house")	88	2	B ⁺ , C ⁺

⁺ PCR pozitiven vzorec

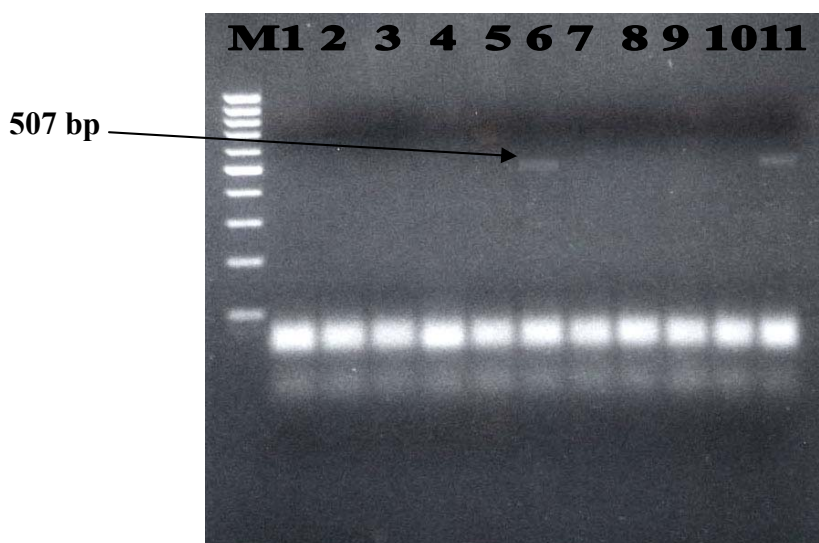
⁻ PCR negativen vzorec

V preglednici 4 so prikazani dobljeni rezultati. Z metodo PCR smo z reagenti Sacace Biotechnologies Srl, Italija testirali 88 vzorcev. DNK *M. genitalium* smo dokazali pri dveh vzorcih (bolnika B in C) (gelska elektroforeza je prikazana na sliki 17).



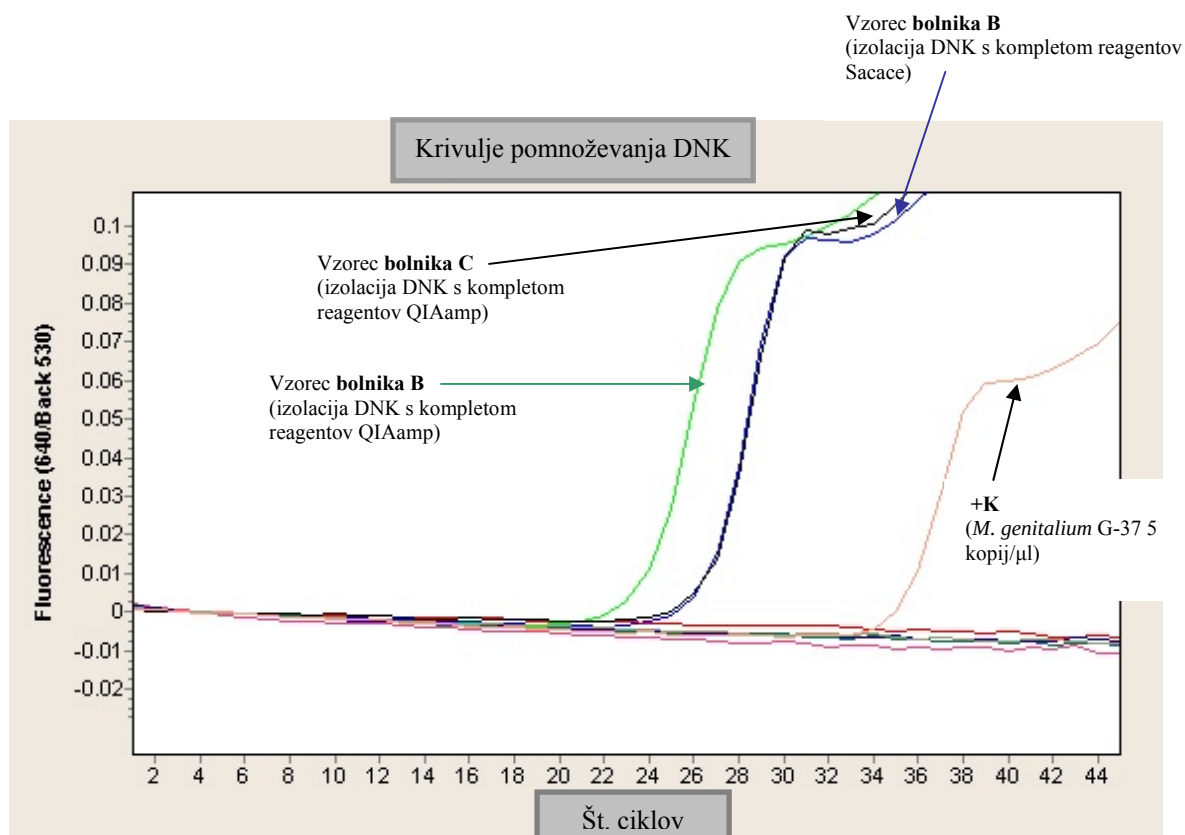
Slika 17: Gelska elektroforeza pridelkov verižne reakcije s polimerazo (PCR) *Mycoplasma genitalium* s kompletom reagentov *Mycoplasma genitalium* 280/550 IC (Sacace Biotechnologies Srl, Italija). M: označevalec molekulske mase v velikosti mnogokratnika 123 baznih parov. IC: interna kontrola. Progi 1 in 7 sta pozitivni kontroli; proga 2 je pozitiven vzorec bolnika B; proga 3 je šibko pozitiven vzorec bolnika C, vidna je tudi interna kontrola; progi 4 in 5 predstavljata negativna vzorca; proga 6 pa je negativna interna kontrola.

Z uporabo reagentov Genekam Biotechnology AG, Nemčija smo testirali 64 vzorcev in DNK *M. genitalium* dokazali pri enem vzorcu (bolnik B) (gelsko elektroforezo kaže slika 18).



Slika 18: Gelska elektroforeza pridelkov verižne reakcije s polimerazo (PCR) *Mycoplasma genitalium* s kompletom reagentov nemškega proizvajalca *Mycoplasma genitalium* (Genekam Biotechnology AG, Nemčija). M: označevalec molekulske mase v velikosti mnogokratnika 100 baznih parov. Proge 1-5 in 7-9 so negativni vzorci; proga 6 je pozitiven vzorec bolnika B; proga 10 je negativna kontrola; proga 11 je pozitivna kontrola.

Vzorci so v Laboratoriju za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami kasneje testirali tudi z metodo PCR v realnem času, s katero so dokazali DNK *M. genitalium* pri vzorcih bolnika B in C (rezultati so prikazani na sliki 19).



Slika 19: Rezultati metode PCR v realnem času za določitev okužbe z bakterijo *Mycoplasma genitalium*. Slika prikazuje število ciklov reakcije PCR v realnem času in krivulje pomnoževanja DNK. Pozitivna sta vzorca bolnikov B in C.

Za izolacijo DNK *M. genitalium* smo uporabili komplet reagentov italijanskega proizvajalca DNA Sorb-A (Sacace Biotechnologies Srl, Italija) in komplet reagentov nemškega proizvajalca QIAamp®DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Nemčija). S kompletom reagentov italijanskega proizvajalca je bilo testiranih 24 vzorcev iz gojišča za urogenitalne mikoplazme (UMMT) in 88 vzorcev iz transportnega gojišča za klamidije (2SP). S kompletom reagentov nemškega proizvajalca je bilo testiranih 88 vzorcev iz

transportnega gojišča za klamidije (2SP). Razlike med uporabljenim kitom za izolacijo DNK ni bilo (v preglednici 5 je prikazana izolacija DNK iz vzorcev).

Preglednica 5: Izolacija DNA z kompletom reagentov DNA Sorb-A (Sacace Biotechnologies Srl, Italija) in QIAamp®DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Nemčija) iz gojišča za urogenitalne mikoplazme (UMMT) in iz transportnega gojišča (2SP).

METODA	Gojišče	Št. vzorcev	Št. pozitivnih vzorcev	Pozitivni vzorci
DNA Sorb-A (Sacace Biotechnologies Srl, Italija)	UMMT	24	0	/
	2SP	88	2	B ⁺ C ⁺
DNA QIAamp®DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Nemčija)	2SP	88	2	B ⁺ C ⁺

V preglednici 6 so prikazani dobljeni rezultati.

Preglednica 6: V preglednici so podani rezultati testiranja brisov sečnice in materničnega vratu za dokaz bakterije *Mycoplasma genitalium* z metodo polimerazne verižne reakcije (PCR).

Vzorci	PCR ⁺	PCR ⁻	Delež (%) pozitivnih
Brisi sečnice moških	2	61	3,2
Brisi materničnega vratu in sečnice	0	25	0
Skupaj	2	86	2,3

Od 88 vzorcev brisov sečnice pacientov in brisov sečnice ter materničnega vratu pacientk z uretritisom, smo z metodo PCR dokazali DNK *M. genitalium* pri dveh bolnikih (B in C), kar predstavlja 2,3 % pregledanih preiskovancev, oziroma 3,2 % moških z uretritisom.

Rezultatov nismo mogli statistično ovrednotiti zaradi premajhnega števila pozitivnih vzorcev.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Bakterija *M. genitalium* je najmanjša prostoživeča bakterija, ki je sposobna samostojnega razmnoževanja (Fraser in sod., 1995). Povzroča okužbe urogenitalnih poti, predvsem pa jo povezujejo z ne-klamidijskim, ne-gonokoknim uretritisom (Svenstrup in sod., 2005). Mikoplazme so prilagojene na parazitski način življenja, saj same niso sposobne sinteze sterolov in številnih biosintetskih prekurzorjev (Blaylock in sod., 2004). Primarno so površinski paraziti in povzročajo kronične okužbe urogenitalnega trakta (Jensen, 2006). Svenstrup in sod. so v statistično značilnem večjem številu dokazali uretritis, izcedek in pekoče uriniranje pri moških, okuženih z *M. genitalium*, kot pri *M. genitalium* negativnih moških. Dokazali so tudi signifikantno večjo količino DNK *M. genitalium* pri bolnikih z uretritisom, kot pri tistih brez uretritisa (Svenstrup in sod., 2005). Yoshida in sod. (2002a) so s testom PCR v realnem času preučevali povezavo med količino bakterijske DNK *M. genitalium* in patogenezo te bakterije v urogenitalnem traktu moških, ki so obiskali oddelek za urologijo na Japonskem. Ugotovili so, da je v vzorcih prvega jutranjega urina moških z ne-gonokoknim uretritisom in ne-klamidijskim ne-gonokoknim uretritisom signifikantno večja količina DNK *M. genitalium*, kot pri moških z gonokoknim uretritisom oziroma pri asimptomatskih moških. Verjetno *M. genitalium* težje kolonizira sečnico, okuženo z *N. gonorrhoeae* (Yoshida in sod., 2002a).

M. genitalium je patogen ljudi, ki se prenaša z spolnimi stiki (Jensen, 2006). Proces infekcije in napredovanja bolezni povezane z *M. genitalium* je odvisen od števila patogenih bakterij, stopnje virulence, tkivnega tropizma, imuno kompetence in drugih gostiteljskih značilnosti ter antimikrobnih intervencij (Blaylock in sod., 2004). Študije na šimpanzih, so potrdile patogene zmožnosti *M. genitalium* (Taylor-Robinson in sod., 1985). Dokazano je, da inokulacija *M. genitalium* v uretro primatov povzroča uretritis. Pri dveh šimpanzih so Tully in sod. izolirali *M. genitalium* tudi iz vzorcev krvi, kar kaže na možnost širitve *M. genitalium* po krvi (Tully in sod., 1986). Bakterijo *M. genitalium* so dokazali tudi v sklepni tekočini bolnikov z artritisom (Taylor-Robinson in sod., 1994). *M. genitalum* lahko s

hematogenim širjenjem iz primarne genitourinarne infekcije ali pa z direktno kolonizacijo okuži tudi mukozne membrane respiratornega in gastrointestinalnega trakta (Baseman in sod., 1997). Rezultati študij na živalih kažejo, da je *M. genitalium* patogen urogenitalnega trakta primatov, ter da se bakterija med partnerji prenaša s spolnim stikom (Jensen, 2006).

Bakterijo *M. genitalium* je težko kultivirati, prav tako ni na voljo standardiziranih diagnostičnih testov, zato je težje študirati vlogo te bakterije v patogenezi (Baseman in sod., 2004). Kultiviranje bakterije *M. genitalium* je drago, saj zahteva posebna gojišča in visoko strokovno znanje. Poleg tega je tudi dolgotrajno, saj se rast pojavi šele po 8 tednih (Stellrecht in sod., 2004). Serološke metode imajo manjši pomen v diagnostiki in epidemioloških študijah okužb z *M. genitalium* zaradi navzkrižnih reakcij med *M. pneumoniae* in *M. genitalium* (Lind, 1982; Jensen, 2006). Poleg tega je potrebna previdnost pri interpretaciji rezultatov seroloških preiskav, saj so na modelu šimpanza dokazali, da protitelesa pri urogenitalni okužbi nastajajo zelo počasi (Tully in sod., 1986). Poleg tega je potrebno testirati parne serume za dokaz aktivne okužbe (Blaylock in sod., 2004).

Za diagnostiko te bakterije so potrebne specifične in občutljive metode PCR (Svenstrup in sod., 2005). Klinične študije o *M. genitalium* so se pričele šele leta 1991 (Jensen in sod., 1991), po objavi metode PCR (Jensen, 2006). Z uporabo testov za pomnoževanje nukleinske kisline, lahko dokažemo infektivne mikroorganizme v manj kot osmih urah (Stellrecht in sod., 2004).

V naši diplomski nalogi smo z metodo PCR uvedli dva testa za molekularno dokazovanje okužb z bakterijo *M. genitalium*, ugotovili prevalenco okužb z *M. genitalium* pri bolnikih iz Dermatovenerološke klinike in Infekcijske klinike v Ljubljani, ter ovrednotili diagnostično metodo PCR.

Molekularni testi, ki slonijo na pomnoževanju nukleinske kisline so v diagnostiki mikroorganizmov lahko problematični zaradi možnih lažno pozitivnih ter lažno negativnih rezultatov (Hardick in sod., 2006). Na občutljivost in specifičnost metode PCR lahko vpliva več dejavnikov, vključno z izvorom in kvaliteto kliničnih vzorcev, pogojev

shranjevanja in obdelave vzorcev, specifičnosti začetnih oligonukleotidov in uporabljenih reagentov. Nizka občutljivost PCR testa je lahko posledica nezadostne količine genetskega materiala v vzorcu ali pa navzočnosti inhibitorjev reakcije PCR (Baseman in sod., 2004). Če vzorci niso primerni, tudi z najboljšo metodo PCR ne dosežemo dobrih rezultatov (Jensen, 2006). Pri precejšnjem deležu pacientov okuženih z *M. genitalium*, je koncentracija DNK bakterije *M. genitalium* v urogenitalnih vzorcih zelo nizka (Jensen in sod., 2004b). Pripravo vzorcev brisa lahko izboljšamo s koncentriranjem vzorcev, kar dosežemo s predhodnim centrifugiranjem. Ker pa je centrifugiranje vzorca časovno potratno, poleg tega pa se s tem korakom zvišuje tveganje za kontaminacijo vzorca, je bolj priporočljivo zbiranje vzorcev v manjšem volumnu transportnega gojišča (Jensen in sod., 2004c). Zamrzovanje vzorcev urina lahko povzroči lizo občutljivih celic *M. genitalium*, zaradi česar je bakterijska DNK izpostavljena Dna-zam, ki so v visokih koncentracijah prisotne v urinu, posledica tega pa so lažno negativni rezultati (Jurstrand in sod., 2005). V nasprotju s to trditvijo so Berg in sod. leta 1997 dokazali, da je zamrzovanje in odtajevanje urinskih vzorcev eden od načinov odstranjevanja inhibitorjev, kar naj bi teoretično zviševalo občutljivost (Berg in sod., 1997). Za dokaz okužbe z *M. genitalium* je zelo pomembna pravilna izbira in odvzem bolnikove kužnine (Jensen, 2006). Jensen in sod. (2004c) so pri določanju najprimernejše kužnine za dokaz DNK *M. genitalium* primerjali vzorce prvega jutranjega urina, brise uretre, ter brise materničnega vratu. Ugotovili so, da so vzorci prvega jutranjega urina pri moških zelo dobri vzorci, za diagnostiko *M. genitalium*, medtem ko so pri ženskah primernejši brisi materničnega vratu (Jensen, 2004c).

V naši raziskavi smo pregledovali brise sečnice in materničnega vratu. Iz Dermatovenerološke klinike in Infekcijske klinike v Ljubljani smo pridobili 88 (63 vzorcev 62 moških in 25 vzorcev 24 žensk) brisov sečnice in materničnega vratu bolnikov in bolnic z uretritisom. Brisi so bili shranjeni v gojišču za urogenitalne bakterije imenovanem UMMT in v transportnem gojišču za klamidije, imenovanem 2SP. Celokupno DNK smo izolirali po protokolu za izolacijo DNK s kompletoma reagentov DNA-Sorb-A (Sacace Biotechnologies Srl, Italija) in QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Nemčija). Pomnoževanje nukleinske kisline smo opravili s kompletom reagentov *Mycoplasma genitalium* 280/550 IC (Sacace Biotechnologies Srl, Italija), s katerim smo

dobili pomnožen fragment DNK velikosti 280 bp in *Mycoplasma genitalium* (Genekam Biotechnology AG, Nemčija), s katerim smo dobili pomnožen pridelek velikosti 507 bp. Pomnožene pridelke smo opazovali z elektroforezo v agaroznem gelu. Kasneje so v Laboratoriju za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami naše vzorce testirali tudi z metodo PCR v realnem času.

Prevalenco okužb z *M. genitalium* lahko napačno ovrednotimo, če za testiranje populacije uporabimo PCR z oligonukleotidnimi začetniki za variabilno regijo gena *MgPa* (Jensen in sod., 2003). V takih situacijah so potrebni potrditveni testi, ki zahtevajo dodaten čas in sredstva. Uporaba več genskih tarč predstavlja alternativno rešitev neskladnih rezultatov različnih testov. Tak test sestavljata dva seta začetnih oligonukleotidov in prob, ki sočasno detektirata različne genske tarče, s tem pa test nudi samo- potrditvene rezultate (Hardick in sod., 2006).

PCR v realnem času je zelo primerna metoda za dokaz okužb z *M. genitalium*. Združuje hkratno pomnoževanje in detekcijo pridelkov, rezultat česar je krajši čas testiranja in višja občutljivost. V nasprotju s tradicionalim PCR s to metodo tudi ni potrebna nadaljna obdelava vzorcev (Hardick in sod., 2006).

Metoda LightCycler PCR je enostavna in je v primerjavi s konvencionalno metodo PCR lažje izvedljiva, poleg tega pa zaradi sočasnega pomnoževanja in detekcije ni potrebna nadaljna obdelava pridelkov PCR, kar zmanjša možnost kontaminacije (Jurstrand in sod., 2005). Metoda LightCycler PCR je tudi hitrejša od konvencionalne metode PCR (Svenstrup in sod., 2005).

Danski raziskovalci so objavili študijo, v kateri so primerjali metodo PCR in metodo LightCycler PCR. Pregledovali so vzorce urinov pri moških in vzorce urinov ter brisov materničnega vratu pri pacientkah, ki so obiskale kliniko za spolno prenosljive bolezni. Z obema metodama so pomnoževali gen za 16S rRNA. Kot pozitiven rezultat so vrednotili pozitiven rezultat, ki so ga dobili z eno ali drugo metodo PCR. Tako pri moških, kot pri ženskah so z metodo LightCycler PCR dokazali manj okužb, kot s konvencionalnim PCR. Od 398 moških, ki so prišli na kliniko za spolno prenosljive bolezni, so z metodama PCR

dokazali DNK *M. genitalium* pri 19 (4,8 %) moških. Z metodo LightCycler PCR so okužbo z *M. genitalium* dokazali pri 14 (74 %), medtem ko so z metodo PCR okužbo z *M. genitalium* dokazali pri 18 (95 %). Od 301 žensk vključenih v raziskavo, so z metodama PCR v vzorcih prvega jutranjega urina in brisa materničnega vratu dokazali DNK *M. genitalium* pri 26 (8,6 %) pacientkah. Metoda LightCycler PCR je detektirala DNK *M. genitalium* pri 19 (73 %) ženskah medtem ko so z metodo PCR dokazali DNK *M. genitalium* pri 22 (85 %) udeleženkah raziskave. Najbolj verjetna razlaga teh ugotovitev je prisotnost inhibitorjev v urinu in manjša količina uporabljene DNK pri LightCycler PCR metodi. Okužbo z *M. genitalium* pri ženskah so z metodo LightCycler PCR, pogosteje dokazali v brisih materničnega vratu 15 (58 %), kot pa v vzorcih prvega jutranjega urina - 10 (38 %), medtem ko so z metodo PCR okužbo z *M. genitalium* v brisih materničnega vratu dokazali pri 17 (65 %), v vzorcih prvega jutranjega urina pa pri 19 (73 %) udeleženkah raziskave (Jurstrand in sod., 2005).

Svenstrup in sod. so z metodo LightCycler PCR ugotavljali pojavnost okužbe z *M. genitalium* pri 246 moških, ki so od avgusta 1997 do novembra 2001 obiskali kliniko za spolno prenosljive bolezni. V brisih uretre so najprej z metodo PCR pomnoževali gen za 16S rRNA in DNK *M. genitalium* dokazali pri 82 preiskovancih. Z metodo LightCycler PCR so pomnoževali gen *gap*, ki kodira encim gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazo. Ta gen je konzervativne narave in se v genomu pojavlja le v eni kopiji. Rezultate so primerjali z metodo PCR, ter z metodo TaqMan PCR v realnem času, s katero so pomnoževali gen *MgPa*. Z LightCycler PCR so dokazali okužbo pri 78 (95,1 %) preiskovancih, ki so bili pozitivni z PCR. Okužbe z *M. genitalium* z metodo LightCycler PCR niso dokazali pri 4 (4,9 %) moških, ki so bili z metodo PCR pozitivni, medtem ko je bilo 6 (3,7 %) vzorcev z metodo LightCycler PCR pozitivnih, z metodo PCR pa negativnih. Dva od teh šestih vzorcev sta bila pozitivna tudi z metodo TaqMan. S testom TaqMan so okužbo z *M. genitalium* dokazali pri 81 preiskovancih. Pri 3 vzorcih so z metodo TaqMan dokazali DNK *M. genitalium*, medtem ko pri teh vzorcih z metodo LightCycler PCR okužbe niso uspeli dokazati (Svenstrup in sod., 2005).

Tudi Edberg s sodelavci (2008) je v primerjalni študiji primerjal tri različne teste PCR za dokaz *M. genitalium* v urogenitalnih vzorcih pacientk in pacientov, ki so obiskali kliniko

za spolno prenosljive bolezni na Švedskem. Od aprila do oktobra 2003 so za primerjavo med dvema različnima testoma PCR v realnem času (s prvim so pomnoževali gen *MgPa*, z drugim pa gen 16S rRNA) in testom PCR (z njim so pomnoževali gen 16S rRNA) zbrali brise sečnice in prve jutranje urine 381 moških in brise materničnega vratu ter prve jutranje urine 298 žensk. DNK *M. genitalium* so dokazali pri 27/381 (7,1 %) moških in pri 23/298 (7,7 %) ženskah. V primerjalno študijo različnih testov PCR so vključili 213 vzorcev; 98 zaporedno zbranih vzorcev prevalenčne študije, 36 zaporedno zbranih vzorcev bolnikov z uretritisom in 79 vzorcev, ki so bili v prevalenčni študiji pozitivni z PCR v realnem času, s katerim so pomnoževali gen *MgPa*. Resnično pozitivni vzorci (76) so bili pozitivni vzorci vsaj dveh PCR testov ali pa sekvenirani vzorci. Devetinštirideset vzorcev je bilo pozitivnih z vsemi tremi testi. Deset vzorcev je bilo pozitivnih le s konvencionalnim PCR (gen 16S rRNA) in s PCR v realnem času (gen *MgPa*). Trije vzorci so bili pozitivni le s PCR v realnem času (gen *MgPa* in 16S rRNA). Dvanajst vzorcev je bilo pozitivnih le s PCR v realnem času (gen *MgPa*). Dva vzorca sta bila pozitivna le s konvencionalnim PCR. PCR v realnem času, s katerim so pomnoževali gen *MgPa*, se je izkazal za najbolj občutljivega izmed vseh treh. Razlog za zelo dobro občutljivost tega testa je najbrž v večji količini uporabljene izolirane DNK v primerjavi z drugimi testi (Edberg in sod., 2008).

Ker je v kliničnih vzorcih količina DNK *M. genitalium* zelo nizka, so nujno potrebni testi z visoko občutljivostjo. Zaradi nizke količine DNK in prisotnosti inhibitorjev v vzorcu bi bilo potrebno izboljšati protokole za pripravo vzorcev. Le tako bi lahko dosegli višjo občutljivost testov, namenjenjenih diagnostiki bakterije *M. genitalium* v kliničnih vzorcih (Edberg in sod., 2008).

Björnelius in sod., (2000) so z metodo PCR ugotavljali prevalenco *M. genitalium* pri moških obiskovalcih klinike za spolno prenosljive bolezni na Švedskem. V študijo so vključili 101 preiskovancev, od katerih jih je imelo 50 ne-gonokokni uretritis, 51 pa jih je bilo v raziskavo vključenih kot kontrole brez uretritisa. Pregledovali so brise sečnice in DNK *M. genitalium* dokazali pri 13 (26 %) bolnikih z uretritisom in pri 5 (10 %) moških iz kontrolne skupine. Pri nobenem bolniku okuženem z *M. genitalium* niso dokazali okužbe s *C. trachomatis*. Pri 36 pacientih z ne-klamidijskim ne-gonokoknim uretritisom je bila prevalenca *M. genitalium* 36 % (Björnelius in sod., 2000).

Tudi Anagrus in sod. (2005) so med septembrom 1995 in oktobrom 1997 preučevali prevalenco *M. genitalium* in *C. trachomatis* pri obiskovalcih klinike za spolno prenosljive bolezni na Švedskem. V raziskavo so vključili 946 obiskovalcev; 445 žensk starih od 14-55 let in 501 moških starih od 17-67 let. Z metodo PCR so za dokaz *M. genitalium* pomnoževali gen za 16S r RNA in gen *MgPa*. Pri moških so pregledovali brise sečnice, pri ženskah pa brise sečnice in materničnega vratu. DNK *M. genitalium* so dokazali pri 58 (6,1 %) preiskovancih; pri 30 (6,0 %) moških in pri 28 (6,3 %) ženskah. Pri dveh moških in eni ženski so dokazali sočasno okužbo s *C. trachomatis*. Okužbo z *M. genitalium* so dokazali pri 17 (13,6 %) od 125 moških z uretritisom in pri dveh (1,2 %) od 161 moških brez znakov uretritisa. Med 130 ženskami z uretritisom, je bilo z *M. genitalium* okuženih 16 (12,3 %), medtem ko so DNK *M. genitalium* dokazali tudi pri 3 (2,2 %) od 138 ženskah brez uretritisa. V raziskavi so preučevali tudi okužbe z *M. genitalum* pri partnerjih. Pregledali so partnerje 26 žensk in dokazali DNK *M. genitalium* pri 38 %. Prav tako so pregledali tudi partnerice okuženih moških in *M. genitalium* dokazali pri 45 % (Anagrus in sod., 2005).

V naši raziskavi smo ugotovili, da je PCR z reagenti Mycoplasma genitalium 280/550 IC (Sacace Biotechnologies Srl, Italija) občutljivejši od PCR, ki smo ga izvedli z reagenti Mycoplasma genitalium (Genekam Biotechnology AG, Nemčija), saj smo z reagenti Sacace Biotechnologies Srl, Italija dokazali okužbo z *M. genitalium* v dveh vzorcih (bolnika B in C), medtem ko smo z reagenti Genekam Biotechnology AG, Nemčija dokazali okužbo le v enem vzorcu (bolnik B). S kompleti reagentov italijanskega proizvajalca smo pri bolniku B na gelski elektroforezi zaznali močno progo velikosti 280 bp, pri bolniku C pa je bila proga velikosti 280 bp šibka, kar je posledica tega, da je bilo v vzorcu malo tarčne DNK *M. genitalium*. Tudi z metodo PCR v realnem času sta bila dva vzorca (bolnik B in C) pozitivna. Tudi tukaj je vidno, da je bilo v vzorcu bolnika B več tarčne DNK *M. genitalium*, saj je bila zaznavna fluorescenca vidna že pri 22 ciklu, medtem ko je bila zaznavna fluorescenca pri bolniku C vidna šele pri 25 ciklu, kar kaže na to, da je bilo v tem vzorcu manj tarčne DNK *M. genitalium*. Predvsem zaradi metode je PCR v realnem času primernejši od klasičnega PCR za dokaz okužb z *M. genitalium*, saj je hitrejši, poleg tega pa je tudi možnost kontaminacije z uporabo te metode veliko manjša. V naši raziskavi smo ugotovili, da sta bili izolaciji DNK z reagenti DNA Sorb-A (Sacace

Biotechnologies Srl, Italija) in z reagenti QIAGEN GmbH, Nemčija enako uspešni. V študiji smo pričakovali, da je najmanj 5 % bolnikov z uretritisom okuženih z *M. genitalium*, saj številne raziskave potrjujejo prisotnost *M. genitalium* pri bolnikih z uretritisom (Jensen in sod., 2003; Ishihara in sod., 2004; Taylor-Robinson in sod., 2001; Keane in sod., 2000). Epidemiološke študije okužb z bakterijo *M. genitalium*, ki so potekale od leta 1993-2002 z molekularno metodo PCR v različnih državah (prevalenco okužb z *M. genitalium* prikazuje preglednica 2) kažejo, da je prevalenca mikoplazem pri moških z akutnim ne-gonokoknim uretritisom od 13-42 %, medtem ko je prevalenca *M. genitalium* pri bolnikih z akutnim ne-klamidijskim ne-gonokoknim uretritisom od 18-46 % (Ishihara in sod., 2004). V naši raziskavi smo DNK *M. genitalium* uspešno dokazali le pri 2,3 % pregledanih bolnikov z urtritisom. Okužbo z *M. genitalium* smo dokazali pri 3,2 % pregledanih moških z uretritisom, medtem ko okužbe z omenjeno bakterijo pri ženskah nismo dokazali. Domnevamo, da smo DNK *M. genitalium* pri bolnikih z uretritisom dokazali v tako nizkem številu zato, ker smo pregledali majhno število vzorcev, lahko pa je bilo nizko število *M. genitalium* pozitivnih bolnikov tudi posledica večkratnega zamrzovanja in odmrzitve vzorcev, saj pri tem lahko pride do propada bakterij in uničenja njihove DNK.

Še vedno se moramo o okužbi z *M. genitalium* veliko naučiti; v tem smislu je to za nas še vedno nova bolezen. Raziskave bi se morale osredotočiti tako na klinični pomen bolezni, kot tudi v diagnostiko bakterije, ki jo povzroča. Za diagnostiko *M. genitalium* so potrebni komercialno dostopni testi z nizko mejo detekcije, kar je z robustnim testnim kompletom reagentov težko doseči. V prihodnosti bi bilo potrebnih več raziskav o povezavi med *in vitro* ter *in vivo* okužbami z *M. genitalium*, več pozornosti pa bi bilo potrebno nameniti tudi gostiteljskim dejavnikom.

5.2 SKLEPI

Na podlagi naše raziskave smo prišli do naslednjih zaključkov:

- PCR je uporabna molekularna metoda za dokazovanje DNK *M. genitalium*
- PCR z reagenti Mycoplasma genitalium 280/550 IC (Sacace Biotechnologies Srl, Italija) je bil občutljivejši od PCR, ki smo ga izvedli z reagenti Mycoplasma genitalium (Genekam Biotechnology AG, Nemčija),
- DNK *M. genitalium* smo dokazali pri 2,3 % pregledanih bolnikov z uretritisom
- Okužbo z *M. genitalium* smo dokazali pri 3,2 % pregledanih moških z uretritisom, medtem ko okužbe z omenjeno bakterijo pri ženskah nismo dokazali

6 POVZETEK

Mycoplasma genitalium je najmanjša prostoživeča bakterija, sposobna samostojnega razmnoževanja. Njen genom vsebuje le gene, potrebne za preživetje. Sposobna je vdreti v človeške celice in se znotraj njih razmnoževati. Zmožnost povzročitve bolezenskih znakov pri ljudeh in potreba po sterolih ter številnih prekursorjih, potrebnih za rast, kažejo na popolnoma parazitski način življenja. Mikoplazme so optimalni paraziti, saj v večini primerov povzročajo kronična obolenja. Prenašajo se s spolnimi stiki in lahko povzročajo ne-klamidijski, ne-gonokokni uretritis.

V preteklosti so bile raziskave o *M. genitalium* ovirane zaradi pomanjkanja natančnih diagnostičnih metod. Diagnostika na podlagi čiste kulture je draga, dolgotrajna, zahteva visoko strokovno znanje, ter posebna selektivna in obogatena gojišča. Dokazovanje bakterije *M. genitalium* v kliničnih vzorcih je olajšala uvedba molekularnih metod. Obsežnejše klinične študije so bile mogoče šele po letu 1990, z uvedbo metode PCR, na kateri temelji laboratorijska diagnostika *M. genitalium* tudi danes. Večina PCR testov temelji na detekciji glavnega adhezinskega gena *MgPa* ali pa gena za 16S r RNK. Uporaba specifičnih seroloških metod v diagnostiki in epidemioloških študijah je neprimerna zaradi navzkrižnih reakcij med *M. pneumoniae* in *M. genitalium*. Metodolgija PCR v realnem času je nadaljnje izboljšala detekcijo bakterije *M. genitalium*. Ta metoda vključuje istočasno pomnoževanje in detekcijo specifičnega odseka nukleinske kisline, za kar je potreben krajši čas, poleg tega pa s to metodo dosežemo tudi višjo občutljivost. Diagnostika okužb z bakterijo *M. genitalium* bi morala temeljiti na metodi PCR v realnem času.

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti prevalenco okužb z *M. genitalium* v vzorcih bolnikov z uretritisom. V raziskovalnem delu smo za dokaz okužbe z *M. genitalium* pri bolnikih z uretritisom uporabili metodo PCR. Diagnostično metodo PCR smo tudi ovrednotili.

Za izolacijo DNK *M. genitalium* smo uporabili komplet reagentov DNA-Sorb-A (Sacace Biotechnologies Srl, Italija) in komplet reagentov QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Nemčija). Dva različna načina izolacije DNK sta bila enako uspešna.

Pomnoževanje nukleinske kisline smo opravili s kompletom reagentov *Mycoplasma genitalium* 280/550 IC (Sacace Biotechnologies Srl, Italija) s katerim smo dobili pomnožen fragment DNK velikosti 280 bp, ter *Mycoplasma genitalium* (Genekam Biotechnology AG, Nemčija), s katerim smo dobili pomnožen pridelek DNK velikosti 507 bp. Pomnožene pridelke smo opazovali z elektroforezo v agaroznem gelu. Od 88 urogenitalnih vzorcev smo pozitiven rezultat dokazali pri 2,3 % pregledanih bolnikov. Okužbe nismo dokazali v nobenem vzorcu brisa sečnice in materničnega vratu pri ženskah. Pri moških smo dokazali prevalenco okužb z *M. genitalium* v 3,2 %.

Ugotovili smo, da je metoda PCR v diagnostiki bakterije *M. genitalium* pri ljudeh primerna. Metoda PCR se je pri vzorcih pacientov izkazala za ustrezno za mikrobiološko diagnostiko.

7 VIRI

Alvarez R. A., Blaylock M. W., Baseman J. B. 2003. Surface localized glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase of *Mycoplasma genitalium* binds mucin. *Molecular Microbiology*, 48: 1417-1425

Anagrius C., Lore B. 2002. Chlamydia-like symptoms can have another etiology. *Mycoplasma genitalium* - an important and common sexually transmitted disease. *Lakartidningen*, 99: 4854-4855, 4858-4859

Anagrius C., Loré B., Jesen J.S. 2005. *Mycoplasma genitalium*: prevalence, clinical significance, and transmission. *Sexually Transmitted Infections*, 81: 458- 462

Arber W. 2000. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 1-7

Baseman J. B., Dallo S. F., Tully J. G., Rose D. L. 1988. Isolation and characterization of *Mycoplasma genitalium* strains from the human respiratory tract. *Journal of Clinical Microbiology*, 26: 2266-2269

Baseman J. B., Lange M., Criscimagna N. L., Giron J. A., Thomas C. A. 1995. Interplay between mycoplasmas and host target cells. *Microbial Pathogenesis*, 19: 105-116

Baseman J. G., Tully J. G. 1997. Mycoplasmas: sophisticated, reemerging and burdened by their notoriety. *Emerging Infectious Diseases*, 3: 21-32

Baseman J. B., Cagle M., Korte J. E., Herrera C., Rasmussen W.G., Baseman J. G., Shain R., Piper J. M. 2004. Diagnostic assesment of *Mycoplasma genitalium* in culture-positive women. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 203-211

Berg E. S., Ånestad G., Moi H., Storvold G., Skaug K. 1997. False negative results of a ligase chain reaction assay to detect *Chlamydia trachomatis* due to inhibitors in urine. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16; 727-731

Björnelius E., Lindbrick P., Jensen J. S. 2000. *Mycoplasma genitalium* in non-gonococcal urethritis – a study in Swedish male STD patients. *International Journal of STD & AIDS*, 11; 292-296

Björnelius E., Jensen J. S., Lindbrink P. 2004. Conjunctivitis associated with *Mycoplasma genitalium* infection. *Clinical Infectious Diseases*, 39: 67-69

Blaylock M.W., Muatovova O., Baseman J. B. 2004. Determination of infectious load of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples of human vaginal cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 746-752

Burgos R., Pich O. Q., Ferrer-Navarro M., Baseman J. B., Querol E., Piñol J. 2006. *Mycoplasma genitalium* P140 and P110 cytoadhesins are reciprocally stabilized and required for cell adhesion and terminal-organelle development. *Journal of Bacteriology*, 188: 8627-8637

Citti C., Rosengarten R. 1997. *Mycoplasma* genetic variation and its implication for pathogenesis. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 109: 562-568

Cohen C. R., Manhart L. E., Bukusi E. A., Astete S., Brunham R., Holmes K., Sinei S., Bwayo J., Totten P. 2002. Association between *Mycoplasma genitalium* and acute endometritis. *Lancet*, 359: 765-766

Collier A. M., Carson J. L., Hu P. C., Hu S. C., Huang C. H., Barile M. F. 1990. Attachment of *Mycoplasma genitalium* to the ciliated epithelium of human fallopian tubes. V: Recent advances in mycoplasmaology. Stanek G. (ed.). Stuttgart, Gustav Fischer Verlag: 730-732

Dallo S. F., Baseman J. B. 2000. Intracellular DNA replication and long - term survival of pathogenic mycoplasmas. *Microbial Pathogenesis*, 29: 301- 309

De Barbyrac B., Bernet Poggi C., Febrer F., Renaudin H., Dupon M., Bebear C. 1993. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* in clinical samples by polymerase chain reaction. *Clinical Infectious Diseases*, 17, Suppl. 1 : S83-S89

Deguchi T., Maeda S., Tamaki M. et. al. 2001. Analytic of the *gyrA* and *parC* genes of *Mycoplasma genitalium* detected in first- pass urine of men with non- gonococcal urethritis before and after fluoroquinolone treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 742-744

Deguchi T., Maeda S. 2002. *Mycoplasma genitalium*: another important pathogen of nongonococcal urethritis. *Journal of Urology*, 167: 1210-1217

Dutro S., Hebb J. K., Garin C. A., Hughes J. P., Kenny G. E., Totten P. A. 2003. Development and performance of a microwell- plate-based polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma genitalium*. *Sexually Transmitted Diseases*, 30: 757-763

Eastick K., Leeming J. P., Caul E. O., Horner P. J., Millar M. R. 2003. A novel polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma genitalium*. *Journal of Clinical Pathology*, 56: 25-28

Edberg A, Jurstrand M. Johansson E., Wikander E., Höög A., Ahlqvist T., Falk L., Jensen J. S., Fredlund H. 2008. A comparative study of three different PCR assays for detection of *Mycoplasma genitalium* in urogenital specimens from men and woman. *Journal of Medical Microbiology*, 57: 304- 309

Fadiel A., Lithwick S., Naftolin F. 2005. The influence of environmental adaptation on bacterial genome structure. *Letters in Applied Microbiology*, 40: 12-18

Falk L., Fredlund H., Jensen J. S. 2003. Tetracycline treatment does not eradicate *Mycoplasma genitalium*. Sexually Transmitted Infections, 79: 318-319

Falk L., Fredlund H., Jensen J. S. 2004. Symptomatic urethritis is more prevalent in men infected with *Mycoplasma genitalium* than with *Chlamydia trachomatis*. Sexually Transmitted Infections, 80: 289-293

Fernald G. W., Collier A. M., Clyde W. A. J. 1975. Respiratory infections due to *Mycoplasma pneumoniae* in infants and children. Pediatrics, 55: 327-335

Fraser, C. M., Gocayne J. D., White O., Adams M. D., Clyton R. A., Fleischmann R. D., Bult C. J., Karlavage A. R., Sutton G., Kelley J. M., in sod. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. Science, 270: 397-403

George R. 2008. Polymerase chain reaction. Northfield, Minesota, Microbial Life, Educational Resources (26 aug. 2008).

http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/genomics/pcr.html (9.9.2008): 1 str.

Glass J. I., Assad-Garcia N., Alperovich N., Yooseph S., Lewis M. R., Maruf M., Hutchinson III C. A., Smith H. O., Venter J. C. 2005. Essential genes of a minimal bacterium. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103: 425-430

Grove D. S. 1999. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the core facility using TaqMan and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division 7700 Sequence Detector. Pennsylvania, State University (7. april 1999)

<http://www.abrf.org/JBT/1999/March99/mar99grove.html> (9.9.2008): 1 str.

Hannan P. C. 1998. Comparative susceptibilities of various AIDS-associated and human urogenital tract mycoplasmas and strains of *Mycoplasma pneumoniae* to 10 classes of antimicrobial agent *in vitro*. Journal of Medical Microbiology, 47: 1115-1122

Hardick J., Giles J., Hardick A., Hsieh Y. H., Quinn T., Gaydos C. 2006. Performance of the gen-probe transmission-mediated amplification research assay compared to that of a multitarget real-time PCR for *Mycoplasma genitalium* detection. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 1236-1240

Hardy R. D. 2005. *Mycoplasma* infections. New York, ACP Medicine. (2005)

<http://www.medscape.com/viewarticle/511754> (9.3.2006): 1 str.

Hay P. E., Taylor-Robinson D. 1996. Defining bacterial vaginosis: to BV or not to BV, that is the question. *International Journal of STD & AIDS*, 7: 233-235

Henry C. H., Hughes C. V., Gerard H. C., Hudson A. P., Wolford L. M., 2000. Reactive arthritis: preliminary microbiologic analysis of the human temporomandibular joint. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 58: 1137-1142

Hooton T. M., Roberts P. L., Holmes K. K., Stamm W. E., Kenny G. E. 1988. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* determined by DNA probe in men with urethritis. *Lancet*, 1; 8580, 266-268

Horner P., Thomas B., Gilroy C. B., Egger M., Taylor-Robinson D. 2001. Role of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* in acute and chronic nongonococcal urethritis. *Clinical Infectious Diseases*, 32: 995- 1003

Hutchison C. A., Peterson S. N., Gill S. R., Cline R. T., White O., Fraser C. M., Smith H. O., Venter J. C. 1999. Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science*, 286: 2165-2169

Ishihara S., Yasuda M., Ito S., Maeda S., Deguchi T. 2004. *Mycoplasma genitalium* urethritis in men. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24, Suppl. 1: S23-S27

Jensen J. S., Uldum S. A., Søndergård-Andersen J., Vuust J., Lind K. 1991. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 29: 46-50

Jensen J. S., Ørsum R., Dohn B., Uldum S., Worm A. M., Lind K. 1993. *Mycoplasma genitalium*: A cause of male urethritis? *Genitourinary Medicine*, 69: 265-269

Jensen J. S., Blom J., Lind K. 1994. Intracellular location of *Mycoplasma genitalium* in cultured Vero cells as demonstrated by electron microscopy. *International Journal of Experimental Pathology*, 75: 91-98

Jensen J. S., Hansen H. S., Lind K. 1996. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 286-291

Jensen J. S., Borre M.B., Dohn B. 2003. Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR amplification of the 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 261-266

Jensen J. S. 2004a. *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology*, 18: 1-11

Jensen J. S., Björnelius E., Dohn B., Lindbrink P. 2004b. Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 683- 692

Jensen J. S., Björnelius E., Dohn B., Lidbrink P. 2004c. Comparison of first void urine and urogenital swab specimens for detection of *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis* by polymerase chain reaction in patients attending a sexually transmitted disease clinic. *Sexually Transmitted Diseases*, 8: 499- 507

Jensen J. S. 2006. *Mycoplasma genitalium* infections. *Danish Medical Bulletin*, 53: 1-27

Jurstrand M., Jensen J. S., Fredlund, H., Fak L., Moling P. 2005. Detection of *Mycoplasma genitalium* in urogenital specimens by real-time PCR and conventional PCR assay. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 23-29

Keane F. E., Thomas B. J., Gilroy C. B., Renton A., Taylor- Robinson D. 2000. The association of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* with non- gonococcal urethritis: observations on heterosexual men and their female partners. *International Journal of STD & AIDS*, 11: 435-439

Kokotovic B., Friis N. F., Jensen J. S., Ahrens P. 1999. Amplified - fragment lenght polymorphism fingerprinting of *Mycoplasma* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3300-3307

Koonin E. V. 2000. How many genes can make a cell: the minimal – gene - set concept. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 1: 99-116

Krause D. C. 1998. *Mycoplasma pneumoniae* cytheadherence: organization and assembly of the attachment organelle. *Trends in Microbiology*, 6: 15-18

Labbe A. C., Frost E., Deslandes S., Mendonca A. P., Alves A. C., Pepin J. 2002. *Mycoplasma genitalium* is not associated with adverse outcomes of pregnancy in Guinea-Bissau. *Sexually Transmitted Infections*, 78: 289-291

Lind K. 1982. Serological cross-reactions between *Mycoplasma genitalium* and *M. pneumoniae*. *Lancet*, 2, 8308: 1158-1159

Lind K., Lindhardt B. Ø., Schütten H. J., Blom J., Christiansen C. 1984. Serological cross-reactions between *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 20: 1036-1043

Lind K., Kristensen G. B. 1987. Significance of antibodies to *Mycoplasma genitalium* in salpingitis. *European Journal of Clinical Microbiology*, 6: 205-207

Lu G. C., Schwebke J. R., Duffy L. B., Cassell G. H., Hauth J. C., Andrews W. W., Goldenberg R. L. 2001. Midtrimester vaginal *Mycoplasma genitalium* in women with subsequent spontaneous preterm birth. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 185: 163-165

Luki N., Lebel P., Boucher M., Doray B., Turgeon J., Brousseau R. 1998. Comparison of polymerase chain reaction assay with culture for detection of genital mycoplasmas in perinatal infections. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 17: 255-263

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th ed. New York, Pearson Education: 409-411

Manhart L. E., Critchlow C. W., Holmes K. K., Dutro S. M., Eschenbach D. A., Stevens C. E., Totten P. A. 2003. Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. Journal of Infectious Diseases, 187: 650-657

Mernaugh G. R., Dallo S. F., Holt S. C., Baseman J. B. 1993. Properties of adhering and nonadhering populations of *Mycoplasma genitalium*. Clinical Infectious Diseases, 17: S69-S78

Miyata M., Seto S. 1999. Cell reproduction cycle of *Mycoplasma*. Biochimie, 81: 873-878

Moxon E. R., Rainey P. B., Nowak M. A., Lenski R. E. 1994. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. Current Biology, 4: 24-33

Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A. 2005. Medical microbiology. 5th ed. Philadelphia, Pennsylvania, Elsevier Inc.: 443-447

Oakeshott P., Hay P., Taylor-Robinson D., Hay S., Dohn B., Kerry S., Jensen J. S. 2004. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* in early pregnancy and relationship between its

presence and pregnancy outcome. International Journal of Obstetrics and Gynecology, 111: 1464-1467

Palmer H. M., Gilroy C. B., Furr P. M., Taylor-Robinson D. 1991. Development and evaluation of the polymerase chain reaction to detect *Mycoplasma genitalium*. FEMS Microbiology Letters, 61: 199-203

Pépin J., Sobela F., Deslandes S. 2001. Etiology of urethral discharge in West Africa: the role of *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis*. Bulletin of the World Health Organization, 79: 118-126

Peterson S. N., Bailey C. C., Jensen J. S., Borre M. B., King E. S., Bott K. F., Hutchison C. A. 1995. Characterisation of repetitive DNA in the *Mycoplasma genitalium* genome: possible role in the generation of antigenic variation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92: 11829 - 33

Razin S., Jacobs E. 1992. Mycoplasma adhesion. Journal of General Microbiology, 138: 407-422

Razin S. 1996. *Mycoplasma genitalium*. V: Medical microbiology. Baron S. (ed.) 4th ed. Texas, University of Texas Medical Branch.
<http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch037.htm> (9.9.2008): 1 str.

Razin S., Yogev D., Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62: 1094-1156

Reddy S. P., Rasmussen W. G., Baseman J. B. 1995. Molecular cloning and characterization of an adherence-related operon of *Mycoplasma genitalium*. Journal of Bacteriology, 177: 5943-5951

Renaudin H, Tully J. G., Bebear C. 1992. *In vitro* susceptibilities of *Mycoplasma genitalium* to antibiotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 36: 870-872

Rogers M. J., Simmons J., Walker R. T. et al. 1985. Construction of the mycoplasma evolutionary tree from 5S rRNA sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82: 1160-1164

Rottem S. 2003. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiological Reviews*, 83: 417-432

Sasaki Y., Shintani M., Shimada T. Watanabe H., Sasaki T. 1992. Detection and discrimination of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* by the *in vitro* DNA amplification. *Microbiology and Immunology*, 36: 21-27

Seto S., Layh- Schmitt G., Kenri T., Miyata M. 2001. Visualization of the attachment organelle and cytodherence proteins of *Mycoplasma pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. *Journal of Bacteriology*, 183: 1621-1630

Svenstrup H.F., Jensen J.S., Bjornelius E., Lindbrink P., Birkelund S., Christiansen G. 2005. Development of a quantitative real-time PCR assay for detection of *Mycoplasma genitalium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 3121-3128

Simms I., Eastick K., Mallinson H., Thomas K., Gokhale R., Hay P., Herring A., Rogers P. A. 2003. Association between *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis* and pelvic inflammatory disease. *Sexually Transmitted Infections*, 79: 154-156

Stellrech K. A., Woron A. M., Mishrik N. G., Venezia R. A. 2004. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 1528- 1533

Swartz S. L., Kraus S. J., Herrman K. L. 1978. Diagnosis and etiology of nongonococcal urethritis. *Journal of Infectious Diseases*, 138: 445-454

Tait I. A., Hart C. A. 2002. *Chlamydia trachomatis* in non-gonococcal urethritis patients and their heterosexual partners: routine testing by polymerase chain reaction. Sexually Transmitted Infections, 78: 286-288

Taylor-Robinson D., Tully J. G., Barile M. F. 1985. Urethral infection in male chimpanzees produced experimentally by *Mycoplasma genitalium*. British Journal of Experimental Pathology, 66: 95-101

Taylor-Robinson D., Gilroy C. B., Horowitz S., Horowitz J. 1994. *Mycoplasma genitalium* in the joints of two patients with arthritis. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 13: 1066-1069

Taylor-Robinson D. 1995. The Harrison lecture: The history and role of *Mycoplasma genitalium* in sexually transmitted diseases. Genitourinary Medicine, 71: 1-8

Taylor-Robinson D. 1996. The history of nongonococcal urethritis. Sexually Transmitted Diseases, 23: 86-91

Taylor-Robinson D., Gilroy C. B., Jensen J. S. 2000. The biology of *Mycoplasma genitalium*. Venerology 13: 119-127

Taylor-Robinson D., Horner P. J. 2001. The role of *Mycoplasma genitalium* in non-gonococcal urethritis. Sexually Transmitted Infections, 77: 229-231

Totten P. A., Schwartz M. A., Kenny G. E., Handsfield H. H., Weiss J. B., Whittington W. L. H. 2001. Association of *Mycoplasma genitalium* with nongonococcal urethritis in heterosexual men. Journal of Infectious Diseases, 183: 269-276

Tully J. G., Taylor-Robinson D., Cole R. M., Rose D. L. 1981. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. Lancet 1, 8233: 1288-1291

Tully, J. G., Taylor- Robinson, D., Rose D. L., Cole R. M., Bove J. M. 1983. *Mycoplasma genitalium*, a new species from the human urogenital tract. International Journal of Systematic Bacteriology, 33: 387- 396

Tully J. G., Taylor-Robinson D., Rose D. L., Furr P. M., Graham C. E., Barile M. F. 1986. Urogenital challenge of primate species with *Mycoplasma genitalium* and characteristics of infection induced in chimpanzees. Journal of Infectious Diseases, 153; 1046-1054

Tully J. G., Shih J. W., Wang R. H., Rose d. L., Lo S. C. 1993. Titers of antibody to *Mycoplasma* in sera of patients infected with human immunodeficiency virus. Clinical Infectious Diseases, 17, Suppl. 1: S254-S258

Uno M., Deguchi T., Komeda H. Yasuda M., Tamaki M., Maeda S., Saiti I., Kawada Y. 1996. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* in men with gonococcal urethritis. International Journal of STD & AIDS, 7: 443-444

Uno M., Deguchi T., Komeda H., Hayasaki M., Iida M., Nagatani M., Kawada Y. 1997. *Mycoplasma genitalium* in the cervixes of Japanese women. Sexually Transmitted Diseases, 24: 284-286

Wang R. Y., Grandinetti T., Shih J. W., Weiss S. H., Haley C. L., Hayes M. M., Lo S. C. 1997. *Mycoplasma genitalium* infection and host antibody immune response in patients infected by HIV, patients attending STD clinics and in healthy blood donors. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 19: 237-245

Webster D., Windsor H., Ling C., Windsor D., Pitcher D. 2003. Chronic bronchitis in immunocompromised patients: association with a novel *Mycoplasma* species. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 22: 530- 534

Yoshida T., Deguchi T., Ito M., Maeda S.I., Tamaki M., Ishiko H. 2002a. Quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology, 40: 1451-1455

Yoshida T., Maeda S., Deguchi T., Ishiko H. 2002b. Phylogeny-based rapid identification of mycoplasmas and ureaplasmas from urethritis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 105-110

ZAHVALA

Prav zaradi diplomske naloge sem spoznala in sodelovala z izjemno osebo – doc. dr. Darjo Keše. Besede ne morejo opisati moje hvaležnosti Vam, ki ste mi ob nastajanju moje naloge vlivali pogum, me bodrili in mi neizmerno pomagali na moji poti. Iz srca se Vam zahvalujem za ves čas, ki ste mi ga namenili, za ves trud, ki ste ga vložili zame, predvsem pa za Vaše razumevanje in potrpljenje. Zares ste bili izjemna so – mentorica.

Iz srca se zahvaljujem tudi tebi, Rok. Vedno si mi bil pripravljen pomagati in vedno si našel odgovore na vsa moja vprašanja.

Hvala laborantkama za pričaranje takšnega vzdušja v laboratoriju, da sem se počutila zares prijetno.

Nadvse sem hvaležna tudi mentorici prof. dr. Evi Ružić – Sabljic in recenzentki prof. dr. Manici Mueller – Premru, saj sta se zelo potrudili in izjemno hitro pregledali diplomu.

Moja X- fax sos (Katja)! Nikoli ne bom pozabila najinih neprespanih noči ob kupih zapiskov in kavi, ki sva jo zlivali vase v želji, da bi noči pred izpiti čimboj produktivno izkoristili. Priznam, da bom tvoje besede : "Ne kompliciraj, sej znava " pošteno pogrešala. Hvala, da si bila vsa ta študijska leta ob meni!

Ida! Tudi tebi hvala, da si mi vedno stala ob strani.

Posebna zahvala gre mojemu Anžetu. Skupaj sva se prebijala skozi moje uspehe in padce. Vem, da sem bila včasih naporna, zato hvala, da si še vedno ob meni ☺ in da verjameš vame.

Tina! Hvala ti za vso pomoč ob nastajanju moje diplomske naloge in številnih seminarjev ter predstavitev tekom mojega študija. Tudi ti s svojimi računalniškimi veščinami si pripomogla k temu, da sem dosegla svoj cilj.

Hvala Anji in Kisi za kvalitetno preživeta študentska leta in spodbudne besede ob nastajanju diplome.

Hvala staršem. Brez vaju ne bi bila to kar sem!

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA
MIKROBIOLOGIJE

Špela ŽULA

**UVEDBA IN OVREDNOTENJE DIAGNOSTIČNE
METODE ZA DOLOČITEV BAKTERIJE
*Mycoplasma genitalium***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

