

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Živa HRASTNIK

**UGOTAVLJANJE OBČUTLJIVOSTI
UROGENITALNIH MIKOPLAZEM ZA
ANTIBIOTIKE V SLOVENIJI**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Živa HRASTNIK

**UGOTAVLJANJE OBČUTLJIVOSTI UROGENITALNIH
MIKOPLAZEM ZA ANTIBIOTIKE V SLOVENIJI**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING FOR GENITAL
MYCOPLASMAS IN SLOVENIA**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Darjo Keše in za recenzentko prof. dr. Darjo Žgur-Bertok.

Mentorica: doc. dr. Darja Keše

Recenzentka: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: 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. Darja ŽGUR-BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Živa Hrastnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 579.24:579.887:615.33(043)=163.6
KG	urogenitalne okužbe/urogenitalne mikoplazme/ <i>Mycoplasma hominis</i> / <i>Ureaplasma</i> spp./antibiotiki/občutljivost za antibiotike/odpornost proti antibiotikom
AV	HRASTNIK, Živa, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	KEŠE, Darja (mentorica)/ŽGUR-BERTOK, Darja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2016
IN	UGOTAVLJANJE OBČUTLJIVOSTI UROGENITALNIH MIKOPLAZEM ZA ANTIBIOTIKE V SLOVENIJI
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. Stopnja Mikrobiologija)
OP	XIV, 72 str., 20 pregl., 29 sl., 1 pril., 50 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AB	Urogenitalne mikoplazme (UM) so ubikvitarni mikroorganizmi, katerih patogeneza še ni popolnoma znana. Ker nimajo celične stene so odporne proti betalaktamom in glikopeptidom ter se ne obarvajo po Gramu. Najdemo jih v urogenitalnem traktu spolno aktivnih oseb. Zlati standard za ugotavljanje okužb z UM je osamitev organizmov na trdnem gojišču, kjer tvorijo značilne kolonije. Za zdravljenje okužb se uporabljajo predvsem makrolidi in tetraciklini, vendar je že prišlo do pojava odpornosti proti njim. V nalogi smo želeli ugotoviti ali je na območju Slovenije že prišlo do pojava odpornosti proti antibiotikom, ki se uporabljajo za zdravljenje urogenitalnih okužb, kot so eritromicin, klindamicin, levofloksacin, moksifloksacin in tetraciklin. V raziskavo smo vključili 111 kužnin iz urogenitalnega trakta bolnikov odvzetih v Univerzitetnem Kliničnem Centru Ljubljana v letih 2013 in 2014, v katerih je bila z metodo PCR dokazana navzočnost DNA <i>M. hominis</i>, <i>U. parvum</i> ali <i>U. urealyticum</i>. Občutljivost UM smo preverjali s pomočjo komercialnega kompleta reagentov Mycofast screening RevolutioN (ELITech, Francija) in z mikrodilucijsko metodo povzeto po standardu Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ter rezultate med seboj primerjali. Testirali smo 105 vzorcev bolnikov, pri katerih je bila z metodo PCR dokazana okužba z <i>Ureaplasma</i> spp. in 6 vzorcev bolnikov z dokazano okužbo z <i>M. hominis</i>. V tekočem gojišču 10B smo v 96 % uspešno nagojili ureaplazme, v tekočem gojišču za mikoplazme pa <i>M. hominis</i> v 50 %. Težavneje je bilo gojenje bakterij na trdnem gojišču A8, kjer je bila uspešnost rasti ureaplazem 59 %, <i>M. hominis</i> pa 83,3 %. Odporne seve ureaplazem proti določenim antibiotikom smo dokazali le pri 7 izolatih ureaplazem, in sicer v štirih primerih proti levofloksacinu (3,81 %), v dveh primerih proti eritromicinu (1,9 %) in v enem primeru proti levofloksacinu ter tetraciklinu hkrati (0,95 %). Odpornost smo lahko določili le s kompletom reagentov Mycofast Revolution, saj izvedba mikrodilucije povzete po standardu CLSI pri teh sevih žal ni bila uspešna.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2
 DC UDC 579.24:579.887:615.33(043)=163.6
 CX urogenital infections/urogenital mycoplasmas/*Mycoplasma hominis*/*Ureaplasma* spp./antibiotics/antibiotic susceptibility/antibiotic resistance
 AU HRASTNIK, Živa
 AA KEŠE, Darja (supervisor)/ŽGUR-BERTOK, Darja (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
 PY 2016
 TI ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING FOR GENITAL MYCOPLASMAS IN SLOVENIA
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
 NO XIV, 72 p., 20 tab., 29 fig., 1 ann., 50 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Urogenital mycoplasma are ubiquitous microorganisms whose pathogenesis is not yet completely known. Because of the lack of a cell wall they are resistant to beta-lactam and glycopeptide antibiotics and cannot stain by Gram. They are common in urogenital tract of sexually active people. The gold standard for the detection of urogenital mycoplasmas is still culture on solid medium, where they form distinctive colonies. General treatment options include agents like macrolides and tetracyclines, but some of the strains became already resistant to them. The aim of this study was to determine whether the territory of Slovenia has been the emergence of urogenital mycoplasmas strains resistant to antibiotics used for the treatment of urogenital infections like erythromycin, clindamycin, levofloxacin, moxifloxacin and tetracycline. The study included 111 specimens from the urogenital tract of patients collected at the University Medical Center Ljubljana in year 2013 and 2014. In all specimens PCR analysis demonstrated the presence of DNA of *M. hominis*, *U. parvum* or *U. urealyticum*. We tested the antimicrobial susceptibility of genital mycoplasmas by using a commercial kit Mycofast screening RevolutionN (ELITech, France) and microdilution method adapted from Clinical and Standards Institute (CLSI). Results of both methods were compared. PCR method has identified *Ureaplasma* spp. in 105 and *M. hominis* in 6 specimens of infected patients. Growth of bacteria in liquid medium 10B was successful in 96 % for ureaplasmas and in mycoplasma broth in 50 % for mycoplasmas. Growth of bacteria on solid medium A8 was more difficult, ureaplasmas grew in 59 %, mycoplasmas in 83,3 %. Resistant strains occurred only in the specimens of patients infected with ureaplasmas, in four cases against levofloxacin (3,81 %), in two cases against erythromycin (1,9 %) and in one case against both levofloxacin and tetracycline (0,95 %). Resistance was determined only with kit Mycofast Revolution, since the microdilution method adapted from CLSI was not possible for these strains.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 UROGENITALNE MIKOPLAZME.....	3
2.1.1 Taksonomija.....	3
2.1.2 Lastnosti urogenitalnih mikoplazem	6
2.1.2.1 <i>Ureaplasma</i> spp.	6
2.1.2.2 <i>Mycoplasma hominis</i>	8
2.1.3 Patogeneza urogenitalnih mikoplazem.....	10
2.1.3.1 Patogeneza bakterij <i>Ureaplasma</i> spp.....	11
2.1.3.2 Patogeneza bakterije <i>Mycoplasma hominis</i>	15
2.1.4 Epidemiologija urogenitalnih mikoplazem	18
2.1.5 Klinična slika	22
2.1.6 Zdravljenje okužb z urogenitalnimi mikoplazmami.....	22
2.1.7 Antibiotiki	23
2.1.7.1 Zaviralci sinteze nukleinskih kislin	24
2.1.7.2 Zaviralci sinteze proteinov	25
2.1.7.3 Občutljivost urogenitalnih mikoplazem za antibiotike in razvoj odpornosti nanje.	27
2.1.7.4 Določanje občutljivosti urogenitalnih mikoplazem za antibiotike	31
2.1.8 Laboratorijska diagnostika	32
2.1.8.1 Izolacija in gojenje urogenitalnih mikoplazem.....	32
2.1.8.2 Molekularne metode	33

2.1.8.3 Serološki testi.....	33
2.1.8.4 Hitri diagnostični testi.....	34
3 MATERIALI IN METODE	35
3.1 MATERIALI	35
3.1.1 Kemikalije in reagenti	35
3.1.2 Drobn laboratorijski material	36
3.1.3 Laboratorijska oprema	36
3.1.4 Bakterijske vrste oziroma klinični vzorci	36
3.1.5 Gojišča za izolacijo urogenitalnih mikoplazem	37
3.1.5.1 Priprava tekočega gojišča 10B z ureo za rast ureaplazem	37
3.1.5.2 Priprava tekočega gojišča za rast <i>Mycoplasma hominis</i>	37
3.1.5.3 Priprava trdnega gojišča A8 za rast urogenitalnih mikoplazem	37
3.1.6 Priprava založnih raztopin antibiotikov	38
3.2 METODE	39
3.2.1 Ugotavljanje občutljivosti urogenitalnih mikoplazem za antibiotike s kompletom reagentov	41
3.2.2 Ugotavljanje občutljivosti urogenitalnih mikoplazem za antibiotike po metodi CLSI	43
3.2.2.1 Izolacija urogenitalnih mikoplazem v tekočem gojišču	43
3.2.2.2 Izolacija urogenitalnih mikoplazem na trdnem gojišču A8	44
3.2.2.3 Kvantifikacija urogenitalnih mikoplazem	44
3.2.2.4 Mikrodilucijski test.....	44
3.2.3 Shranjevanje bakterijskih kultur in gojišč	48
4 REZULTATI	49
4.1 IZOLACIJA UROGENITALNIH MIKOPLAZEM V TEKOČIH GOJIŠČIH IN KVANTIFIKACIJA NA TRDNEM GOJIŠČU A8.....	49
4.1.1 Izolacija in kvantifikacija ureaplazem	49
4.1.2 Izolacija in kvantifikacija bakterije <i>Mycoplasma hominis</i>	51
4.2 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI UROGENITALNIH MIKOPLAZEM S KOMPLETOM REAGENTOV.....	53
4.2.1 Določanje občutljivosti ureaplazem s kompletom reagentov	53

4.2.2	Določanje občutljivosti bakterije <i>Mycoplasma hominis</i> s kompletom reagentov	55
4.3	DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI UROGENITALNIH MIKOPLAZEM Z METODO MIKRODILUCIJE PO STANDARDU CLSI.....	56
4.3.1	Določanje občutljivosti ureaplazem z metodo mikrodilucije po standardu CLSI	56
4.3.2	Določanje občutljivosti bakterije <i>Mycoplasma hominis</i> z metodo mikrodilucije po standardu CLSI.....	57
4.3.3	Primerjava rezultatov občutljivosti pridobljenih s kompletom reagentov Mycofast Revolution z rezultati mikrodilucijske metode po CLSI.....	57
5	RAZPRAVA.....	59
6	SKLEPI	64
7	POVZETEK.....	66
8	VIRI	67
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Opis razreda <i>Mollicutes</i> (Brown in sod., 2010).....	3
Preglednica 2: Pojavnost okužb in klinični znaki okužb z bakterijo <i>Ureaplasma</i> spp. (Jones in sod., 2013).	20
Preglednica 3: Pojavnost in klinični znaki okužb z bakterijo <i>M. hominis</i> (Jones in sod., 2013).....	21
Preglednica 4: Razredi antibiotikov in mehanizmi delovanja (Kotnik, 2002).	24
Preglednica 5: Kriteriji za interpretacijo minimalne inhibitorne koncentracije za bakterijo <i>Ureaplasma urealyticum</i> (CLSI, 2011).	31
Preglednica 6: Kriteriji za interpretacijo minimalne inhibitorne koncentracije za bakterijo <i>M. hominis</i> (CLSI, 2011).	31
Preglednica 7: Mejne koncentracije antibiotikov, ki nakazujejo na občutljivost oziroma odpornost ureaplazem (Redelinghuys in sod., 2013).	42
Preglednica 8: Mejne koncentracije antibiotikov, ki nakazujejo na občutljivost oziroma odpornost <i>M. hominis</i> (Redelinghuys in sod., 2013).....	42
Preglednica 9: Izbira primernih koncentracij antibiotikov za testiranje občutljivosti bakterije <i>M. hominis</i> za antibiotike z metodo mikrodilucije.	46
Preglednica 10: Izbira primernih koncentracij antibiotikov za testiranje občutljivosti bakterij <i>Ureaplasma</i> spp. za antibiotike z metodo mikrodilucije.....	46
Preglednica 11: Dokaz prisotnosti ureaplazem v tekočem gojišču 10B z metodo PCR.	50
Preglednica 12: Prikaz rasti ureaplazem v tekočem gojišču 10B in na trdnem gojišču A8. .	50
Preglednica 13: Prikaz rezultatov rasti bakterij <i>Ureaplasma</i> spp. v tekočem gojišču 10B in na trdnem gojišču A8, glede na jakost produkta PCR.....	51
Preglednica 14: Jakost produkta PCR, rast v tekočem gojišču za mikoplazme in CFU/mL za vzorce pozitivne na bakterijo <i>M. hominis</i>	52
Preglednica 15: Ugotavljanje občutljivosti ureaplazem za določene antibiotike z metodo kompleta reagentov Mycofast Revolution.....	53
Preglednica 16: Število in odstotek izolatov ureaplazem, ki so odporni ali občutljivi za določen antibiotik.	54
Preglednica 17: Vzroki za neuspešnost antibiogramov pri določanju občutljivosti ureaplazem za antibiotike z metodo kompleta reagentov Mycofast Revolution.....	55
Preglednica 18: Ugotavljanje občutljivosti <i>M. hominis</i> za določene antibiotike z metodo kompleta reagentov Mycofast Revolution.....	56

Preglednica 19: Primerjava rezultatov metode kompleta reagentov Mycofast Revolution in mikrodilucije povzete po standardu CLSI za določanje občutljivosti ureaplazem za posamezne antibiotike.	57
Preglednica 20: Primerjava rezultatov metode kompleta reagentov Mycofast Revolution in mikrodilucije po standardu CLSI za določanje občutljivosti <i>M. hominis</i> za posamezne antibiotike.	58

KAZALO SLIK

Slika 1: Filogenetski odnosi v skupini » <i>pneumoniae</i> « reda Mycoplasmatales (Brown in sod., 2010).	4
Slika 2: Filogenetski odnosi v skupi » <i>hominis</i> « reda Mycoplasmatales (Brown in sod., 2010).	5
Slika 3: Kolonije <i>U. urealyticum</i> okoli velike kolonije <i>M. hominis</i> na trdnem agarju za UM (a) in morfologija bakterije <i>U. urealyticum</i> , serovar 4 videne pod transmissijskim elektronskim mikroskopom (b) (Brown in sod., 2010).	8
Slika 4: Koloniji <i>M. hominis</i> v obliki »pečenega jajca« na trdnem gojišču A7 (ELITechGroup, 2015a).	9
Slika 5: Patogeneza urogenitalnih mikoplazem (Medical microbiology, 2015).	10
Slika 6: Primer antigenske variabilnosti: DNA inverzija lokusa za antigen MB in UU172 variabilnega elementa (Zimmerman in sod., 2013).	12
Slika 7: Metabolizem s hidrolizo uree pri <i>Ureaplasma</i> spp. (Glass in sod., 2000).	13
Slika 8: Kromosom <i>M. hominis</i> (EMBL-EBI, 2015).	15
Slika 9: Strukturne lastnosti in primerjava Vaa antigenov (Zhang in Wise, 1996).	16
Slika 10: Različice OppA proteina, regije in sekundarne strukture OppA različic (Hopfe in sod., 2011).	17
Slika 11: Metabolizem s hidrolizo arginina pri <i>M. hominis</i> (Pereyre in sod., 2009).	18
Slika 12: Delovanje florokinolona levofloksacina (NIPA, 2004).	25
Slika 13: Mesta, kjer delujejo antibiotiki, ki zavirajo proteinsko sintezo (Kotnik, 2002)... ..	27
Slika 14: Kolonije bakterije <i>Ureaplasma</i> spp. po 48 urni inkubaciji na trdnem gojišču A8 (Waites, 2005).	32
Slika 15: Kolonije bakterije <i>M. hominis</i> na trdnem A8 gojišču po 72 urni inkubaciji (Waites, 2005).	33
Slika 16: Shema poteka dela.....	40
Slika 17: Potek izvedbe metode Mycofast RevolutioN (ELITechGroup, 2015b).....	41
Slika 18: Testna ploščica za ugotavljanje občutljivosti UM z metodo kompleta reagentov Mycofast Revolution (ELITechGroup, 2015b).	43
Slika 19: Prikaz mikrodilucijske ploščice.	45
Slika 20: Shema mikrotitrne ploščice, kjer smo določili občutljivost <i>M. hominis</i> za antibiotike.	47

Slika 21: Shema mikrotitrne ploščice, kjer smo določili občutljivost bakterij <i>Ureaplasma</i> spp. za antibiotike.	47
Slika 22: Rast bakterij <i>Ureaplasma</i> spp. na trdnem A8 gojišču (izgled kolonij).	50
Slika 23: Umeritvena skala za ovrednotenje jakosti produktov PCR, +/- predstavlja najšibkejši produkt, +++ najmočnejši produkt.	51
Slika 24: Rast bakterije <i>M. hominis</i> v tekočem gojišču za mikoplazme, kjer je zaradi razgradnje arginina prišlo do spremembe pH gojišča in s tem spremembe barve; desno: negativna kontrola.	52
Slika 25: Rast bakterije <i>M. hominis</i> na trdnem A8 gojišču (izgled kolonij).	52
Slika 26: Primer rdeče/oranžnega obarvanja v primeru rasti bakterije <i>Ureaplasma</i> spp. pri metodi Mycofast Revolution, kjer je bakterija zrasla v previsoki koncentraciji ($>10^4$ CFU/mL).	53
Slika 27: Odpornost ureaplazem izoliranih iz urogenitalnih poti bolnikov proti določenim antibiotikom ugotovljena z metodo kompleta reagentov Mycofast Revolution. Legenda: E-eritromicin, LVX-levofloksacin, TE-tetraciklin.	54
Slika 28: Primera rdeče/oranžnega obarvanja v primeru rasti bakterije <i>M. hominis</i> pri metodi Mycofast Revolution, kjer sta v obeh primerih zrasla seva občutljiva za vse testirane antibiotike, koncentracija bakterij pa je bila previsoka ($\geq 10^4$ CFU/mL).	55
Slika 29: Primer rdeče/oranžnega obarvanja v primeru rasti za vse antibiotike občutljivega seva <i>Ureaplasma</i> spp. pri metodi mikrodilucije po standardu CLSI (+K oziroma pozitivna kontrola se je obarvala, medtem, ko pri različnih koncentracijah antibiotikov ni prišlo do obarvanja oziroma rasti organizma).	56

KAZALO PRILOG

Priloga A: Jakost produkta PCR, rast v tekočem gojišču 10B in CFU/mL za vzorce bolnikov z dokazano okužbo z *Ureaplasma* spp.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ADP	adenozin difosfat (ang. »adenosine diphosphate«)
ATCC	ameriška zbirka tipskih kultur (ang. »American type culture collection«)
ATP	adenozin trifosfat (ang. »adenosine triphosphate«)
CCU	število kolonij, ki povzročijo spremembo barve (ang. »colour change units«)
CFU/mL	enota, ki tvori kolonijo (ang. »colony forming unit«)
CLSI	Inštitut za klinične in laboratorijske standarde (ang. »Clinical and Laboratory Standards Institute«)
ddH ₂ O	dvojno destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. »deoxyribonucleic acid«)
E	eritromicin
<i>ermB</i>	gen B z zapisom za eritromicin ribosomsko metilazo
<i>gyrA</i>	gen A z zapisom za DNA girazo
<i>gyrB</i>	gen B z zapisom za DNA girazo
HIV	človeški virus imunske pomanjklivosti (ang. »human immunodeficiency virus«)
<i>hlyA</i>	gen za hemolizin A
<i>hlyC</i>	gen za hemolizin C
IgA	imunoglobulin A
IL	interlevkin
kbp	kilobazni par
LVX	levofloksacin
MB antigen	antigen pri bakteriji <i>Ureaplasma</i> spp., ki se na poliakrilamidni elektroforezi za proteine vidi v obliki številnih pasov (ang. »multiple banded antigen«)
mbp	megabazni par
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
<i>msrA</i>	gen A z zapisom za odpornost proti makrolidom in streptograminom

<i>msrB</i>	gen B z zapisom za odpornost proti makrolidom in streptograminom
<i>msrC</i>	gen C z zapisom za odpornost proti makrolidom in streptograminom
<i>msrD</i>	gen D z zapisom za odpornost proti makrolidom in streptograminom
MXF	moksifloksacin
NTP-aza	nukleozid trifosfataza (ang. »nucleoside-triphosphatase«)
OppA	oligopeptidni permeazni protein za vezavo substrata (ang. »oligopeptide permease substrate binding protein«)
<i>parC</i>	gen C z zapisom za topoizomerozo IV
<i>parE</i>	gen E z zapisom za topoizomerozo IV
PBP	penicilin vezoči protein (ang. »penicillin binding protein«)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. »polymerase chain reaction«)
QRDR	regija za odpornost proti kinolonom (ang. »quinolone resistance determining regions«)
R	organizem odporen proti antibiotiku
RNA	ribonukleinska kislina (ang. »ribonucleic acid«)
S	organizem občutljiv za antibiotik
TE	tetraciklin
<i>tetM</i>	mobilni element oziroma gen za odpornost ureaplazem proti tetraciklinu
UM	urogenitalne mikoplazme
UMMt	univerzalno transportno gojišče za mikoplazme (ang. »universal mycoplasma medium for transport«)
Vaa	variabilen adhezenčni antigen (ang. »variable adherent antigen«)

1 UVOD

Urogenitalne mikoplazme (UM), kamor sodijo bakterije *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* in *Ureaplasma* spp. so potencialno patogene bakterije, vendar jih pogosto najdemo tudi kot komenzale v genitourinarnem traktu spolno aktivnih oseb (Redelinghuys in sod., 2013a).

Okužbe z njimi lahko povzročajo vnetne procese urogenitalnega trakta odraslih oseb in dihal pri novorojencih (Weits in sod., 2012).

So ene izmed najmanjših samopodvajajočih organizmov brez celične stene, zato se ne obarvajo po Gramu in so odporne proti betalaktamom ter glikopeptidom. Za zdravljenje okužb se najpogosteje uporabljajo makrolidi in tetraciklini, vendar pa so se že pojavili sevi odporni za antibiotike (Beeton in sod., 2009a).

Porast bakterijske odpornosti proti registriranim antimikrobnim agensom predstavlja svetovni zdravstveni problem. Ker za Slovenijo še nimamo podatkov o občutljivosti UM za antibiotike, smo se v tem magistrskem delu odločili proučiti, ali so se na našem območju že pojavili sevi z odpornostjo proti določenim antibiotikom. S tem bi pridobili pomembne podatke, ki bi lahko pripomogli k boljšemu in učinkovitejšemu zdravljenju bolnikov.

1.1 NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je bilo ugotoviti ali je na območju Slovenije že prišlo do pojava sevov *Ureaplasma* spp. in *M. hominis* z odpornostjo proti antibiotikom, ki se uporabljajo za zdravljenje urogenitalnih okužb. V raziskavo smo vključili kužnine iz urogenitalnih poti moških in žensk odvzetih v Univerzitetnem Kliničnem Centru Ljubljana, na Infekcijski kliniki v letih 2013 in 2014. V vzorcih so v Laboratoriju za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami inštituta za Mikrobiologijo in imunologijo Medicinske Fakultete dokazali navzočnost DNA *M. hominis*, *U. parvum* ali *U. urealyticum*. Občutljivost UM za eritromicin, klindamicin, levofloksacin, moksifloksacin in tetraciklin smo preverjali s pomočjo komercialnega kompleta reagentov Mycofast screening RevolutioN (ELITech, Francija) in mikrodilucijsko metodo povzeto po standardu Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Želeli smo tudi primerjati rezultate pridobljene s tema dvema metodama.

Cilji naloge:

- ugotoviti ali so se v našem prostoru že pojavili sevi UM, ki so odporni proti posameznim antibiotikom
- primerjati rezultate pridobljene s komercialnim testom za določanje občutljivosti UM z rezultati pridobljenimi z mikrodilucijsko metodo povzeto po standardu CLSI

Delovna hipoteza:

Predvidevamo, da bomo dokazali seve *M. hominis* in *Ureaplasma spp.* odporne na enega ali več testiranih antibiotikov. Prav tako pričakujemo, da bomo rezultate občutljivosti za antibiotike pridobljene s komercialnim kompletom reagentov Mycofast Revolution (ELITech, Francija) potrdili z mikrodilucijsko metodo povzeto po standardu CLSI.

2 PREGLED OBJAV

2.1 UROGENITALNE MIKOPLAZME

2.1.1 Taksonomija

Taksonomija mikoplazem se je zaradi nenehnega pridobivanja znanja o njih močno spreminjala skozi čas. Danes UM uvrščamo v deblo *Tenericutes* in razred *Mollicutes*, ki obsega štiri redove, *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales* in *Anaeroplasmatales*. Red *Mycoplasmatales* je tipski za razred molikutov in vključuje družini *Mycoplasmataceae* ter *Incertae sedis* z nejasno uvrstitvijo v sistem živih bitij. Družina *Mycoplasmataceae* vsebuje rodova *Mycoplasma* in *Ureaplasma*, v katera so uvrščene UM, družina *Incertae sedis* pa dva rodova hemoplazem, *Eperythrozoon* in *Haemobartonella* (Preglednica 1) (Ludwig in sod., 2010).

Preglednica 1: Opis razreda *Mollicutes* (Brown in sod., 2010).

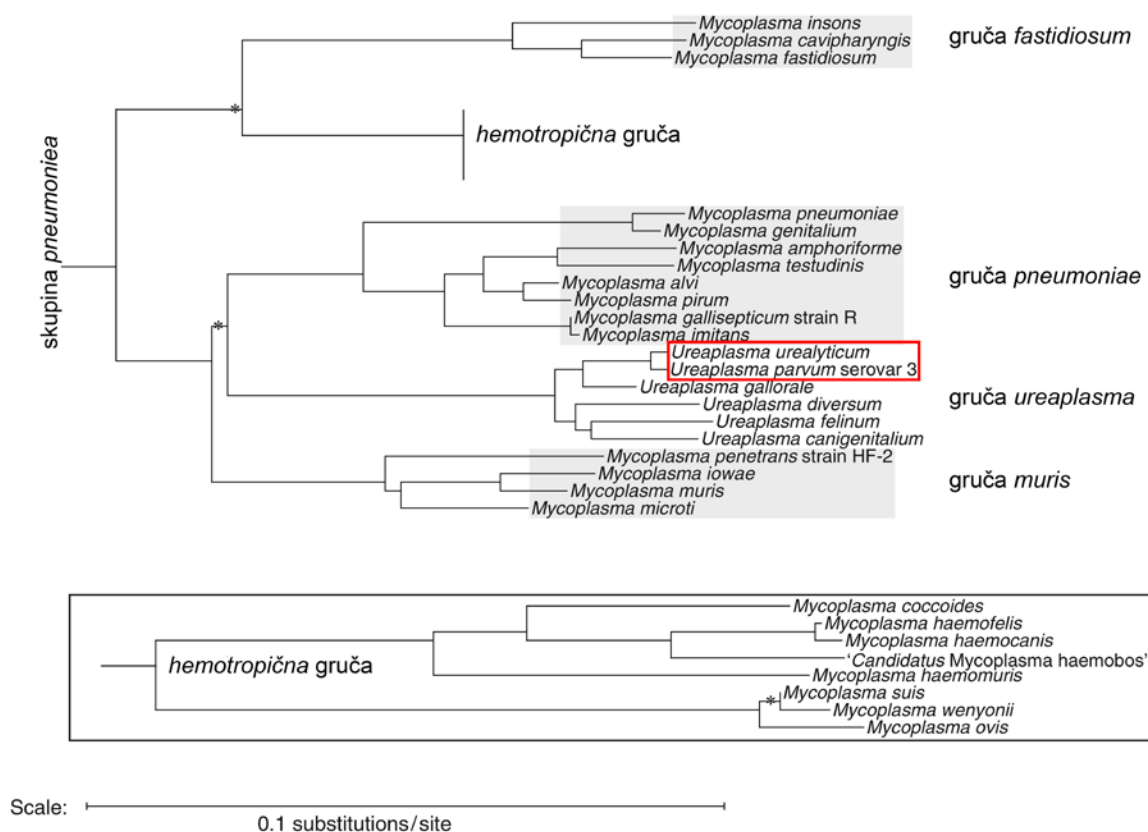
Red	Družina	Rod
I. <i>Mycoplasmatales</i>	<i>Mycoplasmataceae</i>	<i>Mycoplasma</i>
		<i>Ureaplasma</i>
	<i>Incertae sedis</i>	<i>Eperythrozoon</i>
		<i>Haemobartonella</i>
II. <i>Entomoplasmatales</i>	<i>Entomoplasmataceae</i>	<i>Entomoplasma</i>
		<i>Mesoplasma</i>
	<i>Spiroplasmataceae</i>	<i>Spiroplasma</i>
III. <i>Acholeplasmatales</i>	<i>Acholeplasmataceae</i>	<i>Acholeplasma</i>
	<i>Incertae sedis</i>	kandidat <i>Phytoplasma</i>
IV. <i>Anaeroplasmatales</i>	<i>Anaeroplasmataceae</i>	<i>Anaeroplasma</i>
	<i>Anaeroplasmataceae</i>	<i>Asteroplasma</i>

Rod *Ureaplasma* je dobro določen na podlagi sekvenčne filogenije rRNA, bakterije iz rodu *Mycoplasma* pa se nahajajo v vsaj treh filogenetskih linijah oziroma skupinah. Prva skupina družine *Mycoplasmataceae* vsebuje tipsko vrsto *Mycoplasma mycoides*, ki je bolj sorodna entomoplazmam iz tipskega redu *Entomoplasmatales* (Ludwig in sod., 2010).

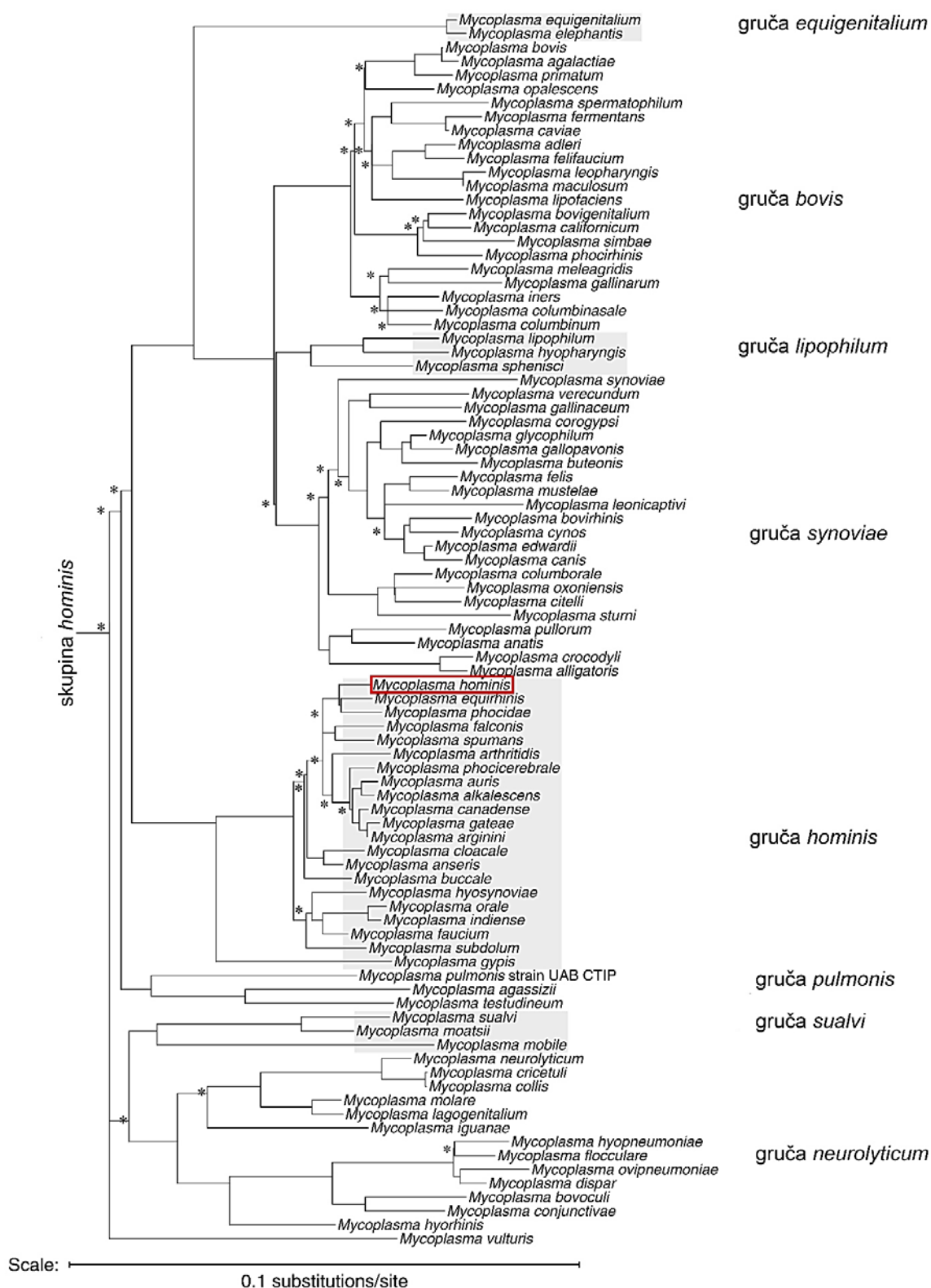
Druga linija se imenuje »skupina *pneumoniae*« in obsega gručo *Ureaplasma* ter štiri gruče *Mycoplasma*, kot so gruča »*fastidiosum*«, »*hemotropična*« gruča, gruča »*pneumoniae*« in gruča »*muris*«. Tipska vrsta *U. urealyticum* in tudi *U. parvum*, ki ju bomo v tem magistrskem delu imenovali s skupnim imenom *Ureaplasma* spp., sta uvrščeni v gručo *Ureaplasma* (Slika 1) (Ludwig in sod., 2010).

Tretja linija oziroma »skupina *hominis*« vključuje preostalih 8 gruč *Mycoplasma*, in sicer gručo »*bovis*«, »*equigenitalium*«, »*lipophilum*«, »*neurolyticum*«, »*pulmonis*«, »*sualvi*«, »*synoviae*« ter »*hominis*«, v katero sodi tudi *M. hominis* (Slika 2) (Ludwig in sod., 2010).

Pogosto uporabljamo trivialen izraz mikoplazma za vse vrste znotraj razreda *Mollicutes*. Prav tako za hemotropične mikoplazme pogosto uporabljajo trivialno ime hemoplazma (Brown in sod., 2010).



Slika 1: Filogenetski odnosi v skupini »*pneumoniae*« reda *Mycoplasmatales* (Brown in sod., 2010).



Slika 2: Filogenetski odnosi v skupini »hominis« reda Mycoplasmatales (Brown in sod., 2010).

2.1.2 Lastnosti urogenitalnih mikoplazem

Mikoplazme so ubikvitarni mikroorganizmi, ki so znani kot živalski patogeni že vse od 19. stoletja (Bebear in sod., 2006). Leta 1898 sta Nocard in Roux prvič izolirala mikoplazmo pri govedu s pljučnico ter jo poimenovala *Mycoplasma mycoides*. Skoraj 40 let kasneje, leta 1937, pa sta Dienes in Edsall opisala prvi primer okužbe človeka z mikoplazmo, ko sta iz žleznega abscesa bolnika izolirala bakterijo *M. hominis*. Leta 1954 je Shepard iz človeškega urogenitalnega trakta prvič izoliral bakterije, ki so tvorile zelo majhne kolonije, zato so jih takrat poimenovali T-sevi (angl. tiny colonies), danes pa so znane kot ureaplazme. Bakterijo *M. genitalium* so odkrili leta 1981 iz brisa sečnice pri bolniku z negonokoknim uretritisom. V zadnjem času sta bili kot možni povzročiteljici oportunističnih okužb pri bolnikih s HIV opisani še vrsti *Mycoplasma fermentans* in *Mycoplasma penetrans* (Bebear in sod., 2006).

Molikuti so paraziti, komenzali ali saprofiti, številni izmed njih so patogeni za človeka, živali in rastline (Holt in sod., 1994). Pri človeku je bilo do sedaj izoliranih 16 vrst molikutov, med katerimi so patogene za človeka *Mycoplasma pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. fermentans*, *Ureaplasma urealyticum* in *U. parvum*. Čeprav *M. genitalium* sodi med UM, v tem magistrskem delu nismo ugotavljali njene občutljivosti za antibiotike, zaradi njene nezmožnosti gojenja v tekočih oziroma na trdnih gojiščih (Waites in sod., 2012a).

Mikoplazme so najmanjši znani prostoživeči, samopodvajajoči organizmi (Beeton in sod., 2009a) pleomorfni oblik, ki so večinoma fakultativni ali obligatni anaerobi. Običajno so negibljivi, določene vrste pa so sposobne drsenja (Holt in sod., 1994). Razvile so se iz po Gramu pozitivnih bakterij z nižjo vsebnostjo gvanina in citozina v njihovem genetskem materialu (Mares in sod., 2011). Ker nimajo celične stene, se ne obarvajo po Gramu in so odporne proti antibiotikom, ki delujejo na celično steno, kot so beta-laktami in glikopeptidi (Beeton in sod., 2009a). Zelo majhen genom in s tem posledično zmanjšana biosintetska sposobnost jih omejuje na parazitski ali saprofitski način življenja. Povprečna velikost genoma je med 580-2200 kilobaznih parov (kbp) (Waites in sod., 2012a). Ker nimajo celične stene in jih obdaja le celična membrana, so zelo občutljive na spremembe v osmotskem tlaku, detergente in alkohole (Holt in sod., 1994).

Zaradi majhnega genoma je za rast omenjenih bakterij gojišče potrebno obogatiti s prekursorji nukleinskih kislin, maščobnih kislin, aminokislin ter s steroli iz konjskega ali govejega seruma (Waites in sod., 2012a).

2.1.2.1 *Ureaplasma* spp.

Ureaplazme sodijo v red *Mycoplasmatales* in družino *Mycoplasmataceae* (Beeton in sod., 2009b). Znotraj razreda *Mollicutes* uvrščamo ureaplazme v skupino *Pneumoniae* (Pereyre

in sod., 2009). Rod *Ureaplasma* vsebuje 7 vrst, med katerimi sta dve vrsti, *U. parvum* in tipiska vrsta *U. urealyticum*, patogeni za človeka (Waites in sod., 2012a). Od rodu *Mycoplasma* se ločijo po sposobnosti hidroliziranja uree, s čimer pridobijo več kot 95 % energije (Beeton in sod., 2009b).

Ureaplazme so pleomorfne, okrogle ali kokobacilarne oblike. Velike so okoli 330 nm v premeru in so mnogo manjše od mikoplazem, zaradi česar so jih sprva opisovali kot T-kolonije (ang. »tiny colonies«). Zaradi njihove majhnosti jih težko opazujemo pod svetlobnim mikroskopom. So negibljive in mikroaerofilne bakterije, ki se razmnožujejo z delitvijo na dvoje, njihov generacijski čas pa znaša eno uro (Dhawan in sod.; 2015; Holt in sod., 1994; Brown in sod., 2010).

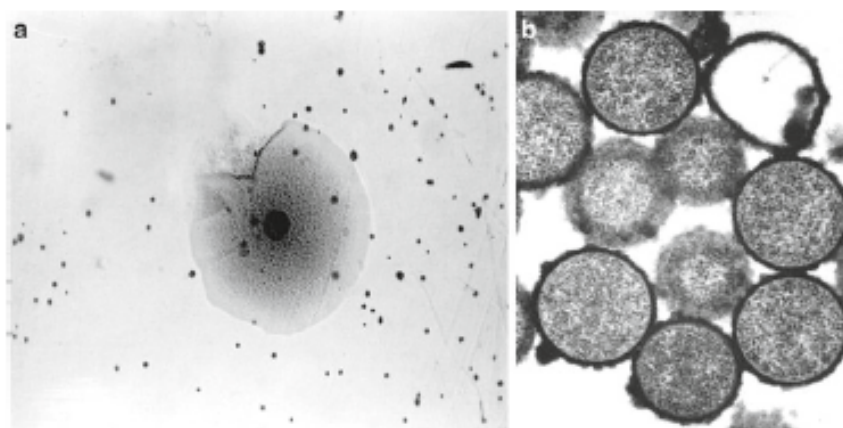
Bakterije vrste *Ureaplasma urealyticum* so najprej ločili v dva različna biovarja, ki so ju nato razdelili v 14 serovarjev. Kasneje so na podlagi sekvenčnih analiz 16S rRNA in velikosti genoma, biovarja uvrstili v dve neodvisni vrsti, *Ureaplasma urealyticum* in *Ureaplasma parvum*. *Ureaplasma urealyticum* vključuje serovarje 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 in 13, medtem ko *U. parvum* serovarje 1, 3, 6 in 14 (Beeton in sod., 2009b).

Velikost genoma serovarjev bakterije *U. parvum* se giblje med 0,75-0,78 megabaznimi pari (mbp) in povprečno vsebujejo 608 genov, od tega 201 gen kodira hipotetične proteine. Velikost genoma pri serovarjih bakterije *U. urealyticum* je večja in se giblje med 0,84-0,95 mbp ter povprečno vsebuje 664 genov, med katerimi 230 genov kodira hipotetične proteine. Pan genom bakterij *Ureaplasma* je sestavljen iz 1020 genov, od tega 515 genov kodira proteine, ki so ohranjeni pri vseh serovarjih ureaplazem (Dhawan in sod., 2015). Ureaplazemska DNA vsebuje od 25 do 31,6 % gvanina in citozina, kar je manj kot pri ostalih molikutih. (Brown in sod., 2010).

Zaradi pomanjkanja celične stene jih ne moremo barvati po Gramu, čeprav so se razvile iz po Gramu pozitivnega prednika. Z elektronsko mikroskopijo so znanstveniki odkrili 5 do 8 nanometrov dolge lasnate strukture podobne pilom, ki se razraščajo iz membrane. S citokemičnimi študijami so pri sevu *U. urealyticum* in serovarju 3 bakterije *U. parvum* dokazali prisotnost kapsularne strukture oziroma lipoglikana, ki se med sevi razlikuje (Brown in sod., 2010).

Vsi sevi so sposobni hidrolize uree do amonijaka in ogljikovega dioksida (Holt in sod., 1994). *Ureaplasma urealyticum* ima nekatere elemente glikolitičnega cikla in pentozne poti, vendar ni sposobna razgraditi glukoze in arginina. Za rast potrebujejo 0,4 do 1 mM ureo. Encim ureaza se nahaja v citoplazmi in je sestavljen iz treh podenot, ki vežejo nikelj. Po vstopu uree in niklja v celico pride do delovanja ureaze ter hidrolize uree do amonijaka in ogljikovega dioksida. Zaradi izvažanja amonijaka iz celice nastane transmembranski potencial, ki omogoči tvorbo visokoenergetske molekule adenzin trifosfata (ATP-ja). Na takšen način ureaplazme proizvedejo 95 % energije (Brown in sod., 2010; Glass in sod., 2000).

Za njihovo rast je v gojišča potrebno dodati sterole v obliki konjskega ali govejega seruma (Brown in sod., 2010). V tekočem gojišču 10B rastejo aerobno, medtem ko na trdnem gojišču A8 z dodano ureo anaerobno. Optimalno rastejo pri temperaturi 36-37 °C, in pri pH 6. V tekočem gojišču pride zaradi rasti ureaplazem do spremembe barve gojišča, na trdnem gojišču pa v 24-48 urah tvorijo pod stereomikroskopom vidne kolonije, ki so zelo majhne in merijo v premeru od 15 do 60 µm. Pojav rjavih, granuliranih kolonij na trdnem gojišču A8 zadošča za identifikacijo bakterij *Ureaplasma* spp. (Slika 3), vendar pa jih po morfologiji ne moremo uvrstiti v posamezno vrsto (Holt in sod., 1994; Waites in sod., 2012a).



Slika 3: Kolonije *U. urealyticum* okoli velike kolonije *M. hominis* na trdnem agarju za UM (a) in morfologija bakterije *U. urealyticum*, serovar 4 videne pod transmissijskim elektronskim mikroskopom (b) (Brown in sod., 2010).

Pri človeku ureaplazme povzročajo spolno prenosljive bolezni, pogosto jih povezujejo z vnetjem sečnice, materničnega vratu, sečnega mehurja, bakterijsko vaginozo in spontanim splavom (Song in sod., 2014).

2.1.2.2 *Mycoplasma hominis*

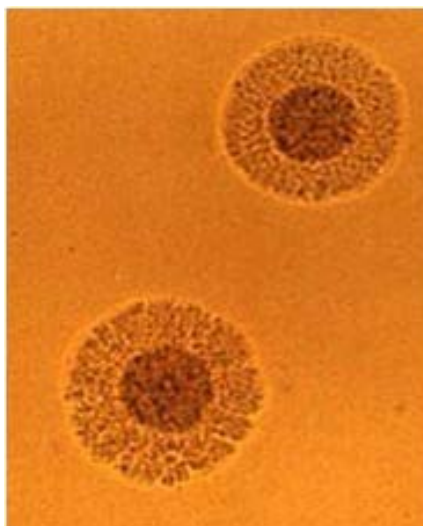
Mycoplasma hominis sodi v red Mycoplasmatales, družino Mycoplasmataceae in rod *Mycoplasma* (Waites in sod., 2012a). Za razliko od ureaplazem jih znotraj razreda *Mollicutes* uvrščamo v skupino Hominis (Pereyre in sod., 2009).

Njen genom je krožni kromosom s 665,445 baznimi pari in 27,1 % vsebnostjo gvanina in citozina. Obsega 537 domnevno kodirajočih DNA zaporedij, 345 genom pa so uspeli dokazati funkcijo (Waites in sod., 2012a; Pereyre in sod., 2009).

Vse mikoplazme so pleomorfne bakterije, sferične do hruškaste oblike, velike od 0,3 do 0,8 µm. Lahko so tudi razvejane filamentozne oblike, ki merijo do 150 µm v dolžino. Celice nimajo celične stene, obdaja jih le plazemska membrana. *M. hominis* je negibljiva, fakultativno anaerobna in katalaza negativna bakterija, kokoidne ali filamentozne oblike, ki

za rast potrebuje holesterole oziroma sterole. Ima kemoorganotrofni metabolizem, katerega glavni vir energije predstavlja arginin, ki ga pridobiva preko arginin hidrolazne poti (Holt in sod., 1994; Brown in sod., 2010). Po vstopu arginina v celico pride do njegove pretvorbe v citrulin, ki je nato pretvorjen v ornitin in karbamoil fosfat. Fosfatna skupina iz karbamoil fosfata se s pomočjo encimov pripne na adenzin difosfat (ADP) in omogoči nastanek visokoenergetske molekule adenozin trifosfata (ATP) (Pereyre in sod., 2009).

Mycoplasma hominis dobro raste v tekočem ali na trdnem gojišču SP4 in tekočem gojišču 10B z dodatkom arginina pri 37 °C. Majhne kolonije zrastejo v 24-48 urah in so podobne obliki »pečenega jajca« (Slika 4). Za popolno identifikacijo so potrebne še dodatne metode kot je verižna reakcija s polimerazo (PCR), saj ni na voljo fenotipskih testov za ločevanje med posameznimi vrstami mikoplazem. Metoda PCR ima večjo občutljivost od gojenja, vendar gojenje še vedno ostaja najbolj ekonomična in praktična metoda za dokazovanje ureaplazem in mikoplazem v številnih laboratorijih (Waites in sod., 2012a).



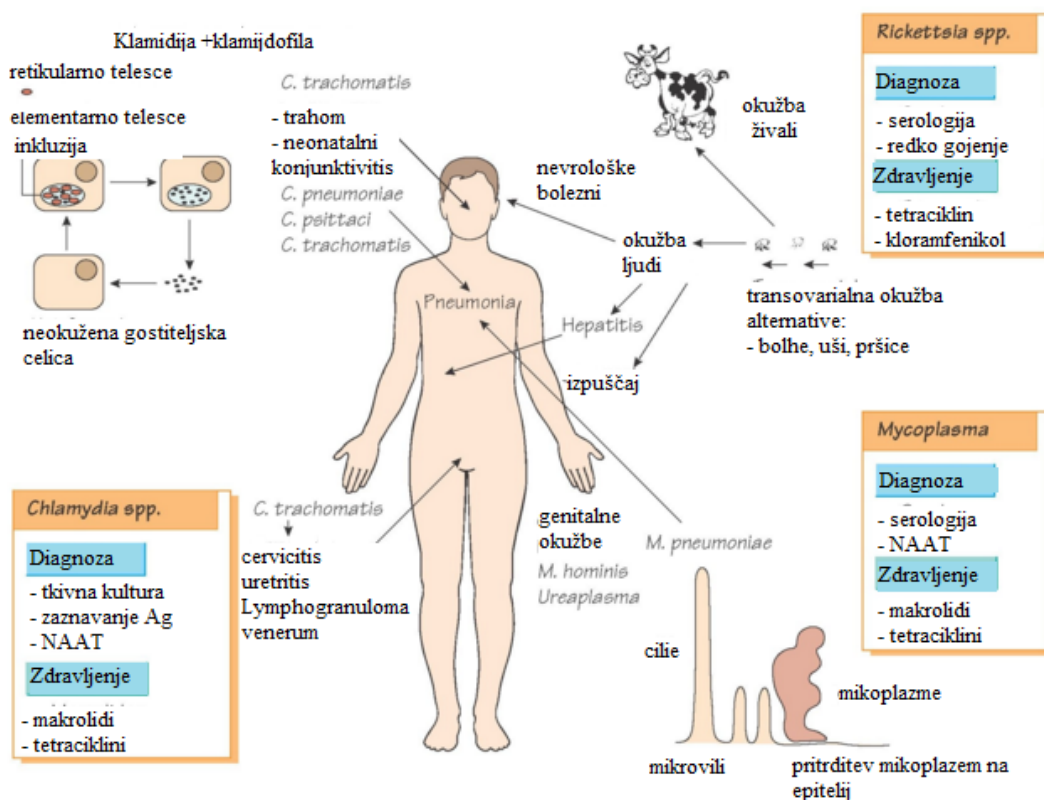
Slika 4: Koloniji *M. hominis* v obliki »pečenega jajca« na trdnem gojišču A7 (ELITechGroup, 2015a).

M. hominis je patogena bakterija, ki jo najpogosteje najdemo v genitalnem traktu človeka, predvsem pri ženskah. Nekatere raziskave kažejo, da se pri imunsko oslabilih osebah lahko pojavi tudi zunaj urogenitalnega trakta. Prenaša se s spolnimi odnosi, z matere na plod, preko katetrov ali presajenih tkiv. Odkrili so tudi okužbe ljudi, kjer *M. hominis* skrita v protozoju *Trichomonas vaginalis*, vstopi v urogenitalni trakt človeka in se tako zaščiti pred imunskim odzivom gostitelja (Brown in sod., 2010).

Za zdravljenje okužb se pogosto uporablja tetracikline, pa tudi novejši makrolidi, ketolidi in kinoloni z visoko aktivnostjo. Tudi pri mikoplazmah je že prišlo do pojavnosti odpornosti proti antibiotikom, zaradi njihove pretirane uporabe (Mares in sod., 2011).

2.1.3 Patogeneza urogenitalnih mikoplazem

V genitalnem traktu ljudi (Slika 5) najpogosteje najdemo 7 vrst molikutov, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. penetrans*, *M. primatum* in *M. spermatophilum*. Med omenjenimi vrstami sta zadnji dve za človeka nepatogeni, medtem ko naj bi bile UM patogene. Zanje je značilno tudi to, da so manjše od običajnih bakterij, prav tako je manjši tudi njihov genom, katerega velikost se giblje med 947 kbp (711 genov) pri *U. urealyticum*, 580 kbp (485 genov) pri *M. genitalium*, 750 kbp (594 genov) pri *U. parvum* in 665 kbp (537 genov) pri *M. hominis* (Ljubin-Sternak in Meštrović, 2014; Waites in sod., 2012a; Pereyre in sod., 2009). Vse štiri vrste UM si med seboj delijo določene skupne gene, ki jim pravimo jedro genoma. Geni, ki kodirajo energetske poti in so vpleteni v patogenezo bakterije, pa so specifični za vsako posamezno vrsto (Pereyre in sod., 2009).



Slika 5: Patogeneza urogenitalnih mikoplazem (Medical microbiology ..., 2015).

Po velikosti genoma je *M. hominis* drugi najmanjši prostoživeči mikroorganizem in se uvršča tik za najmanjšo bakterijo *M. genitalium* (Waites in sod., 2012a). Raziskovalci so odkrili, da sta si bakteriji *M. hominis* in *U. parvum* med seboj izmenjavali genetski material, najverjetneje v času parazitiranja v skupnem gostitelju (Pereyre in sod., 2009).

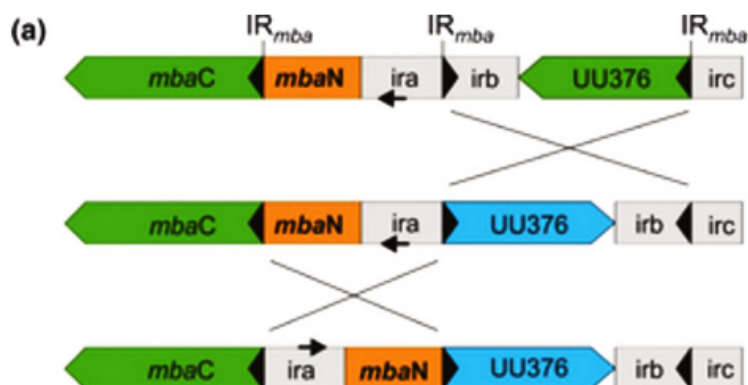
Patogeneza UM še danes ni dobro pojasnjena. Sposobne naj bi bile izločati različne molekule, ki predstavljajo potencialne virulenčne dejavnike. Mednje sodijo proteaza IgA, adhezini, ureaza, fosfolipaze A1, A2 in C, hemolizin ter vodikov peroksid. Domnevajo, da

UM z njimi povzročajo akutne in kronične vnetne odzive v urogenitalnem traktu okuženih oseb (Ponyai in sod., 2013). Poškodbe, ki jih mikoplazme povzročijo, verjetneje nastanejo zaradi vzpodbujenega imunskega in vnetnega odziva gostitelja, kot pa zaradi toksičnosti bakterije (Radelinguys in sod., 2014). Sodelujejo namreč s komponentami imunskega sistema, kar vodi do aktivacije makrofagov in monocitov ter tvorbe citokinov, predvsem tumor nekrotizirajočega faktorja α , interlevkinov (IL-1, IL-1 β , IL-8, IL-12, IL-16) in interferona γ (Taylor-Robinson in Lamont, 2011).

2.1.3.1 Patogeneza bakterij *Ureaplasma* spp.

Velikost genoma ureaplazem se giblje med 947 kbp (711 genov) pri *U. urealyticum* in 750 kbp (594 genov) pri *U. parvum* (Ljubin-Sternak in Meštrović, 2014). Genom je krožen in vsebuje okoli 25,5 % gvanin-citozinskih parov, vsebnost gvanina ter citozina posameznega gena pa nakazuje na njegovo pomembnost za preživetje ureaplazme. Poleg genov za proteine in RNA, hipotetičnih genov in genov z neznano funkcijo, najdemo v genomu ureaplazem tudi gene za virulenčne dejavnike, kot so gen za antigen MB (ang. multiple-banded antigen; na poliakrilamidni elektroforezi se vidi v obliki številnih pasov), gen za proteazo IgA, gen za fosfolipazi A in C, gena *hlyA* in *hlyC*, geni za nukleaze in O-sialoglikoprotein peptidazo ter gen *tetM* (mobilni element) za protimikrobno odpornost. (Glass in sod., 2000).

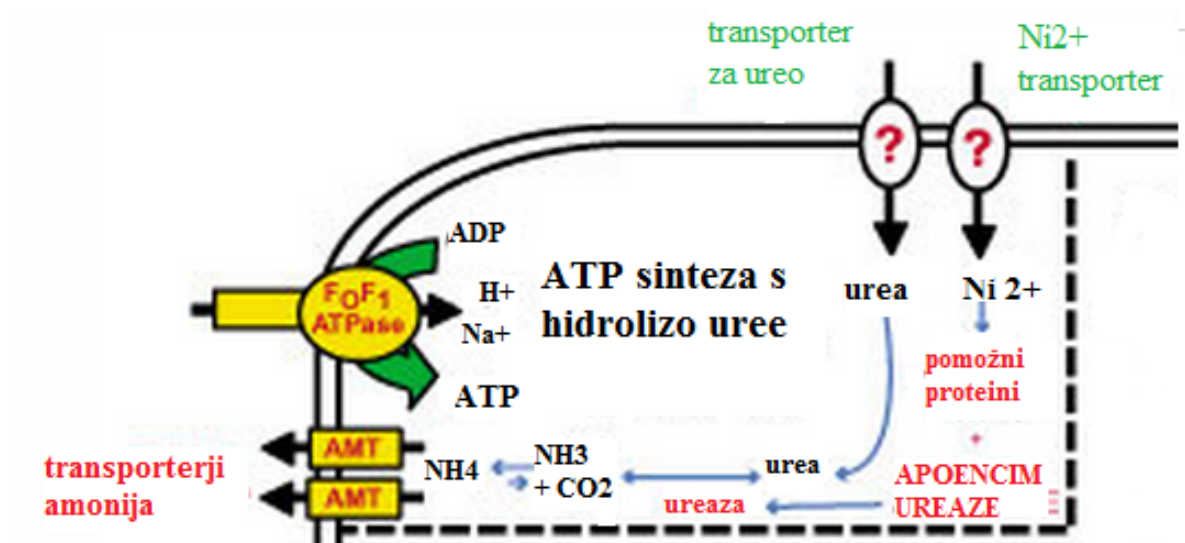
Ureaplazme se lahko pritrdijo na različne tipe celic, od epitelijskih celic sečnice, spermatozoev, do eritrocitov (Waites in sod., 2012a). Spontano se lahko vežejo na nevtrofilce in aktivirajo prvo stopnjo komplementa. Njeni adhezini so proteini, ki so izraženi na površini bakterijske celice in predstavljajo poglobljen virulenčni dejavnik, vendar sistem pritrditve pri bakterijah *Ureaplasma* spp. še ni popolnoma znan. Sposobne so tudi spreminjanja površinskih antigenov, kar jim omogoča zadrževanje na mestu vstopa in izogibanje imunskemu sistemu gostitelja. Na gostiteljsko celico se pritrdijo s pomočjo citoaderenčne beljakovine imenovane antigen MB, ki je močno variabilen in naj bi vseboval za serovar specifične in navzkrižno reaktivne epitope (Waites in sod., 2005). Regija 5' pri genu za antigen MB kodira ohranjen N terminalni konec lipoproteina, medtem ko regija 3' kodira terminalno domeno C, ki je sestavljena iz ponavljajočih se tandemskih enot izpostavljenih na površini bakterijske celice. Terminalna domena C je pri antigenu MB močno imunogena in izzove imunski odziv gostitelja. Insercije ali delecije genov pri ponavljajočih se enotah omogočajo antigensko variacijo MB antigena, do variacij antigena pa lahko pride tudi s pomočjo zamenjav sosednjih genov (Slika 6) (Dahwan in Kokkayil, 2015).



Slika 6: Primer antigenske variabilnosti: DNA inverzija lokusa za antigen MB in UU172 variabilnega elementa (Zimmerman in sod., 2013).

Tudi ureazna aktivnost naj bi predstavljala potencialen virulenčni dejavnik. Zaradi hidrolize uree z encimom ureaza prihaja do sproščanja NH_3 , kar lahko povzroči dvig pH in s tem precipitacijo magnezij-amonijevega fosfata oziroma sečnega kamna. Na ta edinstven način ureaplazme pridobivajo energijo v obliki ATP (Waites in sod., 2005).

S hidrolizo uree pride do ustvarjanja elektrokemijskega gradienta z akumulacijo amonija/amonijaka in s tem pospešenega kemiosmotskega potenciala, ki omogoča sintezo ATP (Slika 7). Proces proizvodnje energije vključuje tri encimatske komponente, ureazo, amonijak/amonijev transporter in F_0F_1 ATP-azo. Ureaza je encim s tremi podenotami, ki vežejo nikelj (Ni^{2+}). Transporterja za nikelj in ureo še nista določena, vendar naj bi genom ureaplazem vseboval določene hipotetične gene, ki bi lahko kodirali omenjena transporterja. Po vstopu uree in niklja v celico pride do delovanja ureaze in hidrolize uree do amonijaka/amonija in ogljikovega dioksida. Koncentracija amonijaka/amonija je znotraj bakterijske celice 21-krat višja od koncentracije zunaj bakterijske celice, zato prihaja do izvažanja amonijaka/amonija preko uniporterja v izvencelično okolje. S tem pride do nastanka elektrokemijskega gradienta, kar pripelje do uvažanja protonov preko ATP-aze tipa F in nastanka ATP-ja. S tem edinstvenim načinom pridobivanja energije ureaplazme proizvedejo 95 % energije v obliki ATP, ostalih 5 % energije pa najverjetneje pridobijo s fosforilacijo substrata (Glass in sod., 2000).



Slika 7: Metabolizem s hidrolizo uree pri *Ureaplasma* spp. (Glass in sod., 2000).

Naslednji potencialni virulenčni faktor ureaplazem je serinska proteaza IgA1, ki naj bi vplivala na specifičnost gostitelja, saj človeške proteaze ne morejo cepiti živalskih protiteles IgA in obratno. Ureaplazmam omogoča vdor v zgornji urogenitalni trakt s cepitvijo ključne komponente imunskega sistema sluznice, protiteles IgA, ki se nahajajo na sluznični površini (Glass in sod., 2000). Ker so Robertson in sod. aktivnost proteaze IgA dokazali pri pacientih z negonokoknim uretritisom kot tudi pri zdravih osebah, je njena vloga v patogenezi ureaplazem še vedno vprašljiva. Tudi Glass in sod. niso odkrili gena, ki bi nosil zapis za proteazo IgA pri *U. parvum*. Predvidevali so, da so se geni za ureaplazemsko proteazo IgA tako oddaljili od ortolognih genov drugih bakterij, da niso več prepoznavni, ali pa so ureaplazme razvile encime brez podobnosti z ostalimi encimi (Waites in sod., 2005).

Možni virulenčni dejavnik so tudi fosfolipaze A1, A2 in C, ki domnevno povzročajo sproščanje arahidonske kisline, povečajo sintezo prostaglandinov in s tem povzročijo prezgodnji porod. Koncentracija citokinov v amnijski tekočini zaradi prisotnosti ureaplazem naraste, zato se sproži povečana sinteza prostaglandinov, kar vpliva na krčenje maternice in prezgodnji porod. De Silva in Quinn sta odkrila fosfolipazno aktivnost pri številnih serotipih ureaplazem. Prav tako sta poročala o različni specifični aktivnosti fosfolipaze A2 glede na serotip, aktivnost fosfolipaze A1 in C pa je bila pri različnih serotipih podobna. (Waites in sod., 2005).

Znano je, da pri *M. pneumoniae* kot hemolizin deluje vodikov peroksid, ki ga bakterija izloča v bližino gostiteljeve celice. Ta ugotovitev je pripeljala do razvoja hipoteze, da je za virulenco mikoplazem delno odgovoren metabolizem reaktivnega kisika. Znanstveniki so domnevali, da enako velja tudi za ureaplazme, vendar so raziskave pokazale, da hemolitična aktivnost bakterij *Ureaplasma* spp. ni inhibirana z navzočnostjo encima

katalaza, kar nakazuje na encimatsko hemolitično aktivnost. Ugotovili so, da genom *U. urealyticum* vsebuje dva gena z zapisom za hemolizin, *hlyA* in *hlyC*. Zaradi dejstva, da ima ortologni zapis za gen *hlyC* tudi *M. pneumoniae* pri kateri je dokazano, da je hemolitična aktivnost posredovana z vodikovim peroksidom, raziskovalci predvidevajo, da je pri ureaplazmah poglavitni hemolizin zapisan z genom *hlyA*. To domnevo dodatno potrjuje tudi navzočnost ortologa *hlyA* v bakteriji *Serpulina hyodysenteriae* in številnih mikobakterijah, kjer je beljakovina HlyA, odgovorna tako za hemolitično kot citotoksično aktivnost. Bakterije iz rodu *Mycobacterium* in *Serpulina*, ki tega gena nimajo, niso patogene (Glass in sod., 2000).

Ureaplazme zaradi majhnosti genoma pridobivajo nukleotide za sintezo DNA in RNA od gostitelja, za kar potrebujejo nukleaze, ki predstavljajo potencialni virulenčni dejavnik. Najverjetneje jih ureaplazme izločajo iz celice ali pa jih imajo pripete na površino, vendar njihova vloga pri patogenezi še ni znana (Paralanov in sod., 2012).

Ureaplazme imajo tudi encim endopeptidazo, ki cepi glikoforin A, sialoglikoprotein v membrani eritrocita. Njena specifičnost je omejena le na O-glikozilirane membranske glikoproteine in ne more cepiti N-glikoziliranih proteinov. Če je O-sialoglikoproteinska peptidaza ureaplazem sposobna cepiti O-sialoproteinske antigene, lahko vdre v gostiteljev imunski sistem. S tem je omogočena kolonizacija gostitelja in sčasoma vzpostavitev okužbe (Paralanov in sod., 2012).

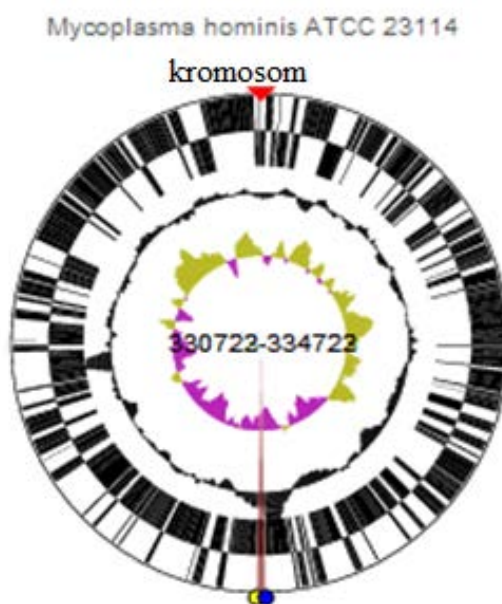
Pomemben virulenčni faktor UM je tudi antimikrobna odpornost pri kateri poznamo več različnih mehanizmov. Genom ureaplazem lahko vsebuje zapis za eno ali več integriranih rekombinaz. Nekateri serovarji vsebujejo transpozaze ali njene ostanke in določene proteine povezane s fagi. Pri ureaplazmah, in sicer serovarju 9, so odkrili gen *tetM*, ki je odgovoren za odpornost bakterije proti tetraciklinu in je del transpozona Tn916 (Dahwan in Kokkayil, 2015). Genom ureaplazme vsebuje še gene *ermB*, *msrA*, *msrB*, *msrC*, *msrD*, ki naj bi pripomogli k intrinzični odpornosti proti makrolidom in linkozamidom, tako da omogočijo izločanje antibiotika iz celice ter metilacijo, lahko pa pride do mutacije v 23S rRNA strukturi. Tudi insercije ali delecije aminokislin v ribosomalnih proteinih L4 in L22 naj bi imele podobno vlogo (Xiao in sod., 2011; Ponyai in sod., 2013; Lu in sod., 2010). Poznane so tudi pridobljene odpornosti UM proti fluorokinolonom, kadar pride do mutacije v *gyrA*, *gyrB*, *parC* in *parE* genih ali pa pride do aktivnega izčrpavanja antibiotika oziroma zmanjšane penetracije antibiotika iz oziroma v bakterijsko celico (Beeton in sod, 2009a; Bebear in Kempf, 2005).

Kljub številnim domnevnim virulenčnim dejavnikom je pri patogenezi UM pomembno poudariti, da sami virulenčni dejavniki in njihovo delovanje še niso popolnoma pojasnjeni (Waite in sod., 2005).

2.1.3.2 Patogeneza bakterije *Mycoplasma hominis*

Patogenezo mikoplazem je izjemno težko pojasniti zaradi visoke stopnje genomske in antigenske raznolikosti znotraj same vrste (Ferandon in sod., 2013).

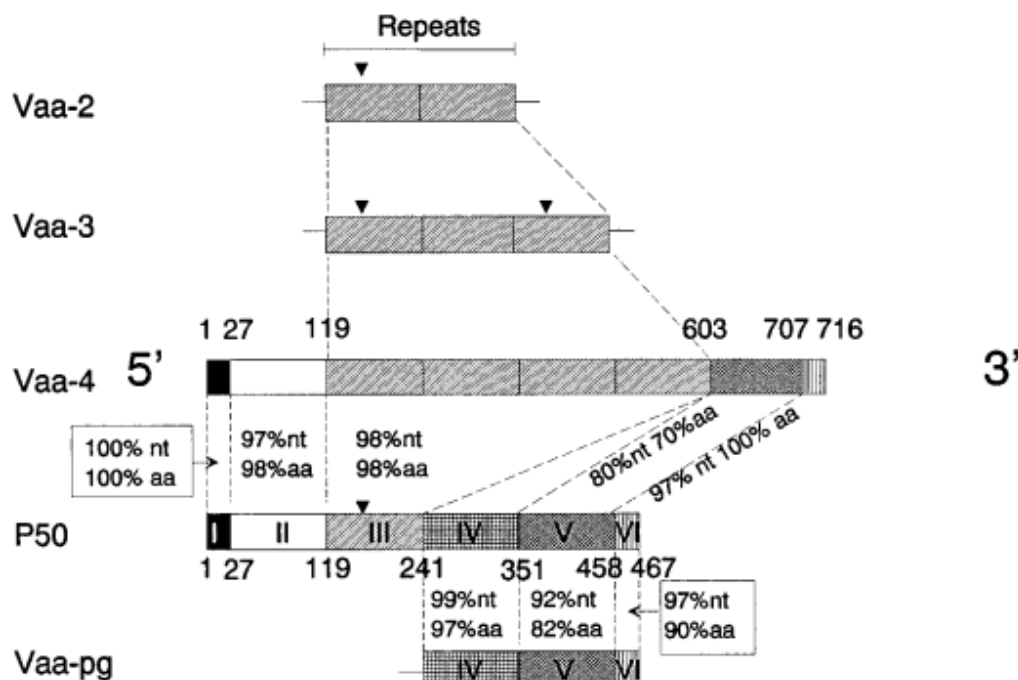
Genom *M. hominis* tipskega seva PG21 je enojni krožni kromosom (Slika 8) s 665,445 bp in 27,1 % vsebnostjo gvanina in citozina. Vsebuje 537 domnevno kodirajočih genov, ki predstavljajo 89,9 % gostote genov. Odkritih je bilo 14 pseudogenov. Funkcijo so določili 345 genom, 86 genov je ohranjenih hipotetičnih proteinov, 106 pa hipotetičnih proteinov. Identificiranih je bilo 33 genov za prenašalno RNA. Znanstveniki so potrdili, da je v preteklosti že prišlo do izmenjave genskih elementov med različnimi vrstami molikutov. Poleg omenjenih genov pa najdemo pri *M. hominis* tudi gene za virulenčne dejavnike, kot so gen za variabilni adhezenčni antigen (*vaa*), oligopeptidni permeazni protein (OppA), lipoproteina P120 in P120', proteine P60 P80, P75, P75 proteinu podoben protein, Lmp1, Lmp3, geni za hidrolizo arginina (Pereyre in sod., 2009).



Slika 8: Kromosom *M. hominis* (EMBL-EBI, 2015).

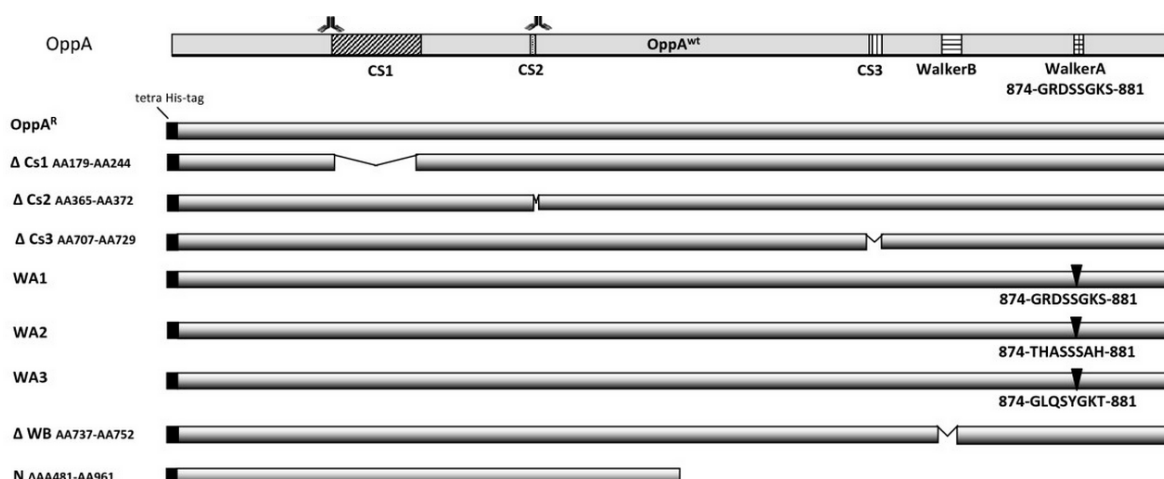
Za okužbo z *M. hominis* je pomembna pritrditev bakterije na površino sluznice, vendar sam potek pritrditve še ni popolnoma pojasnjen. Henrich in sodelavci so dokazali prisotnost variabilnega adhezenčnega antigena (Vaa), ki omogoča pritrditev *M. hominis* na gostiteljsko celico in naj bi imel pglavitno vlogo pri vplivu na imunski odziv gostitelja (Waites in sod., 2012a). Gen *vaa* nosi zapis za površinski lipoprotein z ena do štiri skoraj enakih tandemskih ponavljajočih se enot iz 121 aminokislin v osrednjem delu. Pridobitev ali izguba osrednjih ponovitev v genu *vaa* omogoča nastanek novih različic antigena Vaa. V N-terminalni regiji in osrednji regiji antigena se nahajajo ohranjena zaporedja medtem, ko je C-terminalna regija močno variabilna. Štiri različice glede na velikost antigena, Vaa-

2, Vaa-3, Vaa-4 in P50 (Slika 9) ter variabilnost C-terminalne domene, omogočajo bakteriji *M. hominis* izmikanje imunskemu odzivu gostitelja (Zhang in Wise, 1996).



Slika 9: Strukturne lastnosti in primerjava Vaa antigenov (Zhang in Wise, 1996).

Pomemben virulenčni dejavnik je tudi multifunkcijski lipoprotein OppA, ki omogoča vezavo bakterij na gostiteljevo celico in je verjetno glavna ekto-ATP-aza na površini bakterije *M. hominis*. Novejše študije so dokazale, da inducira sproščanje ATP-ja iz celic, kar privede do celične smrti (Pereyre in sod., 2009). Protein OppA ima številne funkcije: 1. predstavlja domeno za vezavo substrata oligopeptidne permeaze; 2. deluje kot imunogen citoadhezini; 3. predstavlja od magnezija odvisno ekto-ATP-azo, ki omogoča vezavo bakterije na gostiteljevo celico in sproščanje ATP-ja iz celic ter posledično apoptozo. Glede na značilnosti zaporedja ATP-azne domene, spada protein OppA v razred nukleozid trifosfataz (NTP-az) s P-zanko, sestavljeno iz motiva Walker A oziroma ohranjene P-zanke in manj ohranjenega motiva Walker B (Slika 10). Le pri bakteriji *M. hominis* se NTP-aza s P-zanko nahaja na površini bakterijske celice, kar je posebnost (Hopfe in sod., 2011).



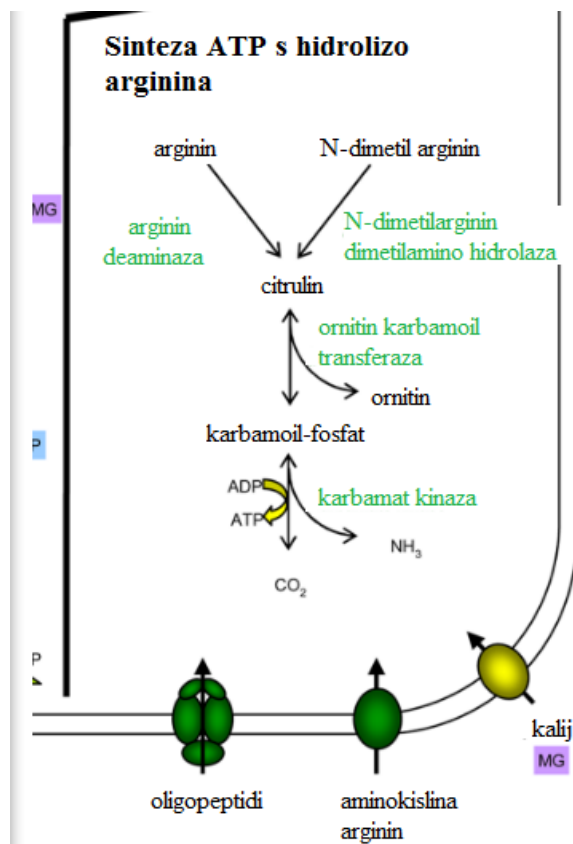
Slika 10: Različice OppA proteina, regije in sekundarne strukture OppA različic (Hopfe in sod., 2011).

Pri vezavi na gostiteljevo celico lahko sodelujejo še številni drugi proteini, kot so proteini P60, P80, P75, P75 proteinu podoben protein, Lmp1 in Lmp3, ki se prav tako nahajajo na površini bakterijske celice. Pri patogenezi *M. hominis* naj bi sodelovala tudi lipoprotein P120 in P120', ki sta površinska, antigensko variabilna proteina (Pereyre in sod., 2009).

Leta 1991 sta Taylor-Robinson in Lamont odkrila sposobnost vdora *M. hominis* v gostiteljeve celice na modelu celic HeLa. Po 15 letih so znanstveniki dokazali, da je *M. hominis* sposobna tudi vdiranja v spermatozoje in spreminjanja morfologije sperme. Prihajalo naj bi tudi do simbiotske povezave *M. hominis* s protozom *Trichomonas vaginalis*, kjer slednji omogoča okužbo gostitelja z bakterijo *M. hominis* ter njeno zaščito pred imunskim odzivom gostitelja (Taylor-Robinson in Lamont, 2011; Hopfe in sod., 2013).

Mycoplasma hominis pridobiva ATP s hidrolizo arginina (Slika 11) (Waites in sod., 2005). Geni za neglikolitični metabolizem Embden-Mayerhoff-Parnas-ove poti kodirajo vse potrebne encime razen 6-fosfofrukto kinaze, pri pentozo fosfatni poti pa manjkata encima glukoza-6-fosfat dehidrogenaza in 6-fosfoglukonat dehidrogenaza. Pri ostalih genih, ki kodirajo encime karbohidratnega encima, manjkata zapisa za 1-fosfofrukto kinazo in piruvat dehidrogenazni kompleks. Pri *M. hominis* (tipski sev PG21) so odkrili tri proteine, ki sestavljajo arginin dihidrolazno pot, in sicer arginin deaminazo, ornitin karbamoiltransferazo in karbamat kinazo ter najverjetneje sodeluje še dimetilarginin dimetilaminohidrolaza, ki pretvarja N-alkilirane konce arginina v citrulin. Za vstop arginina v celico nosi genom zapis za domnevni transporter arginina, zapisa za transporter amonijaka/amonija pa pri *M. hominis* niso odkrili. Arginin dihidrolazna pot omogoča pretvorbo arginina do ornitina in amonijaka tako, da pride do odstranjevanja dušika iz aminokislin in tvorbe ATP-ja. Arginin deaminaza in domnevna N-dimetilarginin dimetilaminohidrolaza pretvorita arginin do citrulina, ki ga nato ornitin karbamoil transferaza pretvori v ornitin in karbamoil fosfat. Karbamat kinaza pripne fosfatno skupino

iz karbamoil fosfata na ADP, zaradi česar pride do nastanka ATP-ja, hkrati pa se sprostita še amonijak in ogljikov dioksid (Pereyre in sod., 2009).



Slika 11: Metabolizem s hidrolizo arginina pri *M. hominis* (Pereyre in sod., 2009).

Sproščanje amonijaka v visokih količinah naj bi imelo toksičen učinek za celice, vendar za to še ni trdnega dokaza (Pereyre in sod., 2009).

Pri *M. hominis* niso dokazali proteaze IgA in fosfolipazne aktivnosti za razliko od ureaplazem (Waites in sod., 2005).

2.1.4 Epidemiologija urogenitalnih mikoplazem

Patogeneza UM še danes ostaja nepojasnjena, saj so jih pogosto izolirali iz genitalnega trakta zdravih oseb, zato so še vedno predmet številnih raziskav (Waites in sod., 2005). Kolonizacija urogenitalnega trakta z UM je po puberteti pri obeh spolih posledica spolne aktivnosti, zato pogostost kolonizacije narašča s številom spolnih partnerjev (Ponyai in sod., 2013). Okužba z njimi je odvisna od posameznikove starosti, socialno-ekonomskega statusa, menstrualnega cikla, nosečnosti in uporabe vaginalnih kontraceptivov (Ljubin-Steranek in sod., 2014).

Raziskave kažejo, da so okužbe z UM pogostejše pri ženskah, posebno v času nosečnosti. Kar 40-80 % zdravih, asimptomatskih žensk ima sluznico materničnega vratu ali nožnice kolonizirano z ureaplazmami, več kot 50 % pa z bakterijo *M. hominis*. Kolonizacijo genitalnega trakta z ureaplazmami so odkrili tako pri spolno neaktivnih ženskah (40 %), kot pri spolno aktivnih ženskah (67 %) in ženskah v menopavzi (25 %) (Song in sod., 2013).

Okužbe spodnjega genitalnega trakta z ureaplazmami pri zdravih, asimptomatskih moških so redkejšje in se pojavijo v 20-29 % (Song in sod., 2013). Tudi novorojenci so lahko okuženi z ureaplazmami, približno v 20 % (Ljubin-Sternak in Meštrović, 2014).

Iz urogenitalnih kužnin spolno aktivnih, simptomatskih žensk in moških prav tako pogosto izolirajo bakterijo *U. urealyticum*, medtem ko so okužbe z *M. hominis* redkeje dokazane (Ponyai in sod., 2013).

Okužbe z ureaplazmo se prenašajo s tveganimi spolnimi odnosi oziroma z vertikalnim prenosom v maternici iz matere na plod ali pri samem porodu. Naseljujejo urogenitalno sluznico desetine spolno aktivnih moških in več kot polovice spolno aktivnih žensk. *Ureaplasma parvum* se v urogenitalnem traktu žensk in moških ter respiratornem traktu novorojenčkov pojavlja pogostejše kot *U. urealyticum*, vendar pa je *U. urealyticum* povezana s težjimi kliničnimi slikami in tudi pogostejše povzroča uretritis pri moških (Waites in sod., 2012a; Marovt in sod., 2014).

Okužbe z ureaplazmami so pogostejše pri mlajših ženskah, ženskah z nižjim socialno-ekonomskim statusom, s številnimi spolnimi partnerji, ženskah črne rase in tistih, ki prejemajo oralne kontraceptike (Marovt in sod., 2014). Obsežne študije so pokazale pogoste okužbe z ureaplazmami v Kanadi pri nosečnicah, ki so imele spontani splav (84,5 %) in v Keniji pri ženskah s poporodnim endometritisom (77 %). V Argentini in ZDA so okužbe z ureaplazmami redke in se v manj kot 5 % pojavijo pri spolno aktivnih ženskah in neplodnih ženskah (Preglednica 2) (Jones in sod., 2013).

Tako kot ureaplazme, se tudi bakterija *M. hominis* prenaša s tveganimi spolnimi odnosi ter vertikalnim prenosom iz matere na plod (Ihan in Avšič-Županc, 2002). Kolonizacija z njo je prav tako odvisna od starosti bolnika, števila spolnih partnerjev, hormonalnih sprememb in socialno-ekonomskega statusa (Keše in sod., 2014).

Pogosto prihaja do sočasnih okužb ljudi z *M. hominis* in bakterijami *Ureaplasma* spp. (Waites in sod., 2012a). Včasih lahko povzroči sistemske okužbe pri novorojencih in imunsko oslabljenih osebah. Bakterijo *M. hominis* so večkrat dokazali pri bolnicah z bakterijsko vaginozo, vendar je njen prispevek k patološkim procesom še neznan. Znano pa je, da visoke koncentracije *M. hominis* lahko privedejo do vdora bakterije tudi v zgornji urogenitalni trakt. Posebna je tudi njena sposobnost sodelovanja s *Trichomonas vaginalis*,

kjer *M. hominis* parazitira znotraj trihomonasa, ki tako deluje kot »trojanski konj« za prenos mikoplazemske infekcije do gostitelja (Keše in sod., 2014).

Študije v Veliki Britaniji in Keniji so pokazale, da se okužbe z *M. hominis* najpogosteje pojavljajo pri ženskah z bakterijsko vaginozo (53 %) in pri ženskah s poporodnim endometritisom (53 %). Danska študija je ugotovila okužbe z *M. hominis* pri moških z negonokoknim uretritisom v 36 %, prav tako so v podobnih odstotkih dokazali okužbe z omenjeno bakterijo tudi pri nosečnicah na švedskem (34,7 %) ter bolnikih z rakom prostate v Rusiji (30,5 %). V manj kot 10 % pa so okužbe dokazali v ZDA, Mehiki, Turčiji, Palestini, Kitajski, Italiji in Srbiji. Prav tako so v nižjem deležu dokazali okužbe v Japonski (12 %-17 %), Indiji (10,7 %), Argentini (14,1 %), Nemčiji (13 %) in Hrvaški (14,13 %) (Preglednica 3) (Jones in sod., 2013).

Preglednica 2: Pojavnost okužb in klinični znaki okužb z bakterijo *Ureaplasma* spp. (Jones in sod., 2013).

Država	Populacija	Št. testiranih oseb	Št. oseb okuženih z ureaplazmo	% oseb okuženih z ureaplazmami
Kanada	Nosečnice s spontanim splavom	71	60	84,5
Kenija	Ženske s poporodnim endometritisom	30	23	77
Argentina	Spolno aktivne ženske	100	4	4
ZDA	Neplodne ženske	80	4	5

Preglednica 3: Pojavnost in klinični znaki okužb z bakterijo *M. hominis* (Jones in sod., 2013).

Država	Populacija	Št. testiranih oseb	Št. oseb okuženih z <i>M. hominis</i>	% oseb okuženih z <i>M. hominis</i>
Velika Britanija	Ženske z bakterijsko vaginozo	17	9	53
Kenija	Ženske s poporodnim endometritisom	35	19	53
Danska	Moški z negonokoknim uretritisom	85	31	36
Švedska	Nosečnice	37	13	34,7
Rusija	Moški z rakom prostate	118	36	30,5
ZDA	Neplodni moški	80	4	5
Mehika	Bolniki z urogenitalno okužbo	436	9	2
Turčija	Neprodne ženske	50	4	8
Palestina	Bolniki s piurijo	200	2	1
Kitajska	Bolniki z veneralno boleznijo	239	10	4,18
Italija	Neprodni moški	115	3	2,6
Srbija	Hetero moški	299	24	8,02
Japonska	Noseče ženske, prezgodnji porod	90	15	17
Indija	Ženske z bakterijsko vaginozo	327	35	10,7
Argentina	Noseče ženske	198	28	14,1
Nemčija	Moški z uretritisom	143	19	13
Hrvaška	Moški z uretritisom	184	26	14,13

2.1.5 Klinična slika

Urogenitalne mikoplazme lahko pri odraslih povzročajo različne zaplete, kot so uretritis, artritis, poporodni endometritis, prezgodnji porod, pljučnico, bakteriemijo, abscese, pri novorojencih pa meningitis in kronično pljučno bolezen (Waites in sod., 2012a).

Za ureaplazme predvidevajo, da so pogosti potencialni patogeni, ki povzročajo spolno prenosljive bolezni. Rezultati raziskav nakazujejo možno povezavo med okužbo z ureaplazmami in vnetjem sečnice pri moških, materničnega vratu, sečnega mehurja, bakterijsko vaginozo, spontanim splavom, prezgodnjim porodom ter neplodnostjo (Song in sod., 2014). *Mycoplasma hominis* naj bi povzročala vnetje sečnice, salpingitis, bakterijsko vaginozo, neplodnost, spontani splav, prezgodnji porod, nizko težo novorojencev ter okužbo dihal in živčevja novorojencev (Diaz in sod., 2013). Pri imunsko oslabelelih osebah in novorojencih lahko mikoplazme povzročijo sistemske okužbe (Waites in sod., 2012a). Razsejane ureaplazemske in mikoplazemske okužbe se pojavljajo pri bolnikih s hipogamaglobulinemijo, medtem ko pri odraslih imunsko zmožnih osebah UM redko povzročajo izveng genitalne okužbe (Keše in sod., 2014). Ker so UM odkrili tudi pri zdravih osebah v podobnem odstotku kot pri bolnikih, je težko pojasniti njihovo vlogo v patogenezi naštetih bolezni (Song in sod., 2014).

2.1.6 Zdravljenje okužb z urogenitalnimi mikoplazmami

Zdravljenje okužbe z UM je empirično. Najpogosteje se uporablja antibiotik doksiciklin, pri nosečnicah ali pri bolnikih z alergijo na doksiciklin pa se uporablja azitromicin za zdravljenje okužb z bakterijo *Ureaplasma* spp. oziroma klindamicin za zdravljenje okužb z bakterijo *M. hominis*. Za zdravljenje sočasnih okužb z ureaplazmami in bakterijo *Chlamydia trachomatis* se uporablja azitromicin, saj sta obe bakteriji občutljivi zanj. Za okužbe s sevi *U. urealyticum*, ki lahko tvorijo biofilm, priporočajo uporabo klaritomicina (Ponyai in sod., 2013). Poleg naštetih antibiotikov, se pogosto uporabljajo tudi ostali tetraciklini in fluorokinoloni, kot so ofloksacin, ciprofloksacin, levofloksacin, gemifloksacin in moksifloksacin (Redelinghuys in sod., 2013).

Pri zdravljenju okužb z UM je predvsem pomembna pravilna izbira zdravila pri nosečnicah, saj so nekatera protimikrobna sredstva lahko teratogena in povzročajo spremembe oziroma funkcionalne okvare embrija ali fetusa, lahko pa imajo tudi toksične učinke za novorojenca. Makrolidi se pogosto uporabljajo empirično, saj se tetraciklinov in fluorokinolonov tekom nosečnosti ne uporablja. Eritromicin ni sposoben prehoda v amnijsko votlino, prav tako ne more uničiti ureaplazem v sluznici nožnice ali vratu nožnice. Novejši makrolidi, kot so azitromicin in klaritomicin, imajo ob zaužitju enkrat dnevno zelo dober učinek in manj stranskih učinkov kot zdravljenje z eritromicinom (Radelyngus in sod., 2014).

Zaradi nenehne uporabe širokospektralnih antibiotikov je prišlo do zvišanja stopnje odpornosti ureaplazem in mikoplazem proti njim (Ye in sod., 2014), zato možnosti zdravljenja okužb z UM postajajo vse bolj omejene. (Radelynghus in sod., 2014).

2.1.7 Antibiotiki

Antibiotiki so mikrobní, polsintetični ali sintetični metaboliti z nizko molekulsko maso, ki ob nizkih koncentracijah zavirajo rast mikroorganizmov (Lancini in sod., 1995). Proizvajajo jih lahko različne vrste bakterij in gliv. Kemoterapevtiki so antimikrobna zdravila, ki so izdelana s sintezo ali kemijsko modifikacijo naravnega antibiotika. Obe metodi izboljšata njihove antimikrobne in farmakološke lastnosti. Sodobni antibiotiki so večinoma kemoterapevtiki, klinično pa je uporabnih manj kot 1 % znanih antibiotikov, zaradi njihove toksičnosti ali nesposobnosti vstopa v gostiteljevo celico (Madigan in sod., 2009; Kotnik, 2002).

Glede na proizvodnjo jih delimo na naravne, ki so proizvedeni s strani mikroorganizmov in sintetične, ki nastanejo s spremembami naravnih antibiotikov ali ostalih mikrobnih metabolitov. Iz kemijskega vidika gre za zelo heterogeno skupino organskih trdnih spojin. Njihovo delovanje na bakterijo je lahko baktericidno ali bakteriostatično (Kohanski in sod., 2010). Baktericidni antibiotiki poškodujejo mikroorganizem tako, da se ni več zmožen razmnoževati, medtem ko bakteriostatični antibiotiki razmnoževanje le zavrejo (Kotnik, 2002). Glede na organizme na katere delujejo jih razdelimo na protibakterijske, protiglívne in protiprotizojske antibiotike (Lancini in sod., 1995).

Občutljivost bakterij za antibiotike je med drugim odvisna od strukture celične stene, ki vpliva na prodiranje antibiotika v bakterijsko celico. Na podlagi te lastnosti jih delimo na antibiotike, ki delujejo na po Gramu pozitivne bakterije, na antibiotike, ki delujejo na po Gram negativne bakterije in na antibiotike, ki delujejo na mikobakterije (Lancini in sod., 1995). Če antibiotik deluje tako na po Gramu pozitivne kot tudi na po Gramu negativne mikroorganizme, govorimo o širokospektralnem antibiotiku. Primer takšnega antibiotika je tetraciklin. Kadar pa antibiotik deluje izključno na eno skupino mikroorganizmov, govorimo o ozkospektralnem antibiotiku (Madigan in sod., 2009).

Glede na mehanizem delovanja razlikujemo štiri vrste antibiotikov (Preglednica 4), in sicer takšne, ki:

- preprečujejo sintezo celične stene (npr. penicilini)
- delujejo na sintezo znotrajceličnih beljakovin (npr. aminoglikozidi)
- vplivajo na sintezo nukleinskih kislin (npr. kinoloni)
- ovirajo dejavnosti povezane s citoplazemsko membrano (npr. polimiksini) (Kotnik, 2002)

Preglednica 4: Razredi antibiotikov in mehanizmi delovanja (Kotnik, 2002).

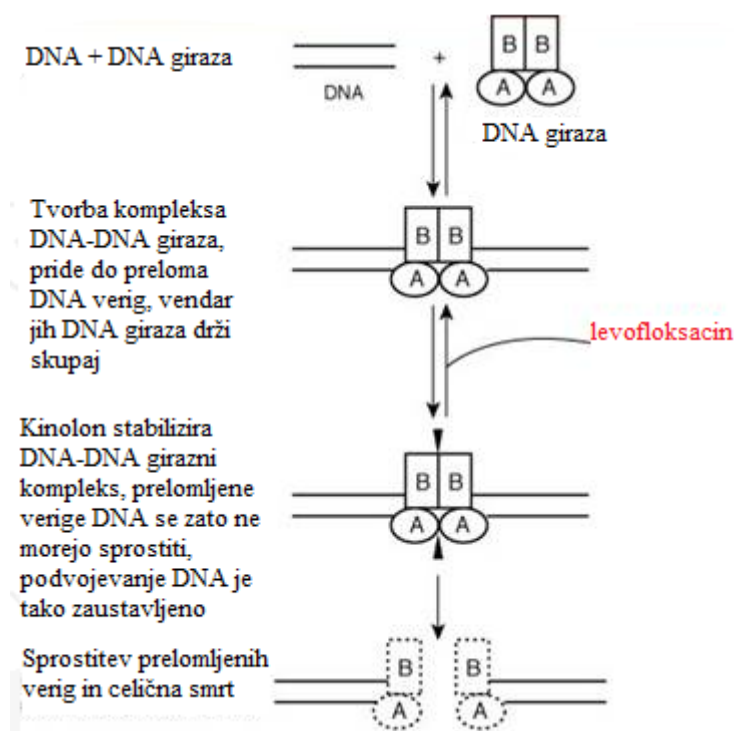
Skupina antibiotikov	Razred antibiotikov	Mehanizem delovanja
Zaviralci sinteze celične stene	Betalaktami: - penicilini - cefalosporini - karbapenemi - monobaktami	Zavirajo delovanje transpeptidaze (PBP-penicilin vezoči protein), ki katalizira sintezo celične stene. Novonastala celična stena ni navzkrižno povezana, pride do avtolitičnih procesov.
	Glikopeptidi: - vankomicin - teikoplanin	Preprečevanje transglikozilacije in delovanja PBP z vezavo D-alanil-D-alail končne enote peptidoglikana. Pride do avtolitičnih procesov.
Zaviralci sinteze nukleinskih kislin	Sulfonamidi	Preprečujejo vgradnjo paraaminobenzojske kisline v tetrahidropentojsko kislino in s tem zavrejo sintezo folne kisline.
	Trimetoprim	Zavira delovanje dihidrofolatne reduktaze, encima, ki katalizira nastanek folne kisline.
	Kinoloni in fluorokinoloni (npr. levofloksacin in moksifloksacin)	Zavirajo delovanje DNA-giraze in topoizomerase IV in s tem vplivajo na oblikovanje bakterijskega kromosoma. Pride do nastanka dvojnih prelomov in kasneje do celične smrti.
Zaviralci sinteze proteinov	Aminoglikozidi	Vežejo se na ribosomsko podenoto 30S in preprečijo prevajanje mRNA ter tako zavrejo sintezo proteinov.
	Tetraciklini (npr. tetraciklin)	Vežejo se na ribosomsko podenoto 30S in preprečijo dostop aminoacil prenašalnih RNA molekul do ribosoma.
	Makrolidi (npr. eritromicin)	Vežejo se na domeno V 23S rRNA na podenoti ribosoma 50S in preprečijo translacijo.
	Piranozoidi-linkozamidi (npr. klindamicin)	Podobno kot makrolidni antibiotiki.
	Kloramfenikol	Veže se na ribosomsko podenoto 50S in zavre delovanje peptidiltransferaze ter s tem prepreči nastanek peptidnih vezi.
	Fucidinska kislina	Z vezavo na elongacijske faktorje, gvanozindifosfat in ribosome zavre sintezo beljakovin.
Zaviralci delovanja celične membrane	Polimiksini	Povzroči razgradnjo fosfolipidnega dvosloja.

2.1.7.1 Zaviralci sinteze nukleinskih kislin

Med zaviralce sinteze nukleinskih kislin sodijo tudi kinoloni in fluorokinoloni, ki so danes ena iz med najpomembnejših skupin sintetično pridobljenih antibiotikov. So derivati nalidiksične kisline. Odkriti so bili leta 1960 kot stranski produkt pri sintezi klorokina oziroma kinina, ki se je uporabljal za zdravljenje okužb sečil. Delujejo tako, da zavirajo delovanje DNA-giraze in s tem vplivajo na oblikovanje bakterijskega kromosoma. Pri sintezi DNA, prepisovanju RNA in celični delitvi so potrebne spremembe v kromosomskem supernavitju, kjer sodeluje encim topoizomerase. Glavno tarčo te skupine antibiotikov predstavljata topoizomerase II (DNA giraza) in topoizomerase IV. Antibiotik deluje tako, da se veže na encim in zaustavi delovanje topoizomerase v stopnji cepitve DNA ter s tem prepreči ponovno združevanje koncev verig. Nastanejo dvoverižni DNA prelomi,

posledica česar je takojšnja bakteriostaza in kasneje tudi celična smrt (Slika 12). Pri bakteriostatičnih koncentracijah je reakcija reverzibilna (Kohanski in sod., 2010; Kotnik, 2002).

V magistrski nalogi smo preverjali občutljivost UM za antibiotik levofloksacin, ki sodi v 3. generacijo kinolonskih antibiotikov (Kohanski in sod., 2010, Kotnik, 2002).



Slika 12: Delovanje florokinolona levofloksacina (NIPA, 2004).

2.1.7.2 Zaviralci sinteze proteinov

Do prevajanja RNA pride po treh zaporednih stopnjah (iniciaciji, elongaciji in terminaciji), kjer sodelujejo ribosomi in drugi citoplazemski pomožni faktorji. Bakterijski ribosom je sestavljen iz dveh ribonukleoproteinskih podenot, 50S in 30S podenote, ki se povežeta tekom iniciacije, ko pride do nastanka kompleksa med mRNA transkriptom, prenašalno RNA, nekaj iniciacijskimi faktorji in prosto 30S podenoto (Kohanski in sod., 2010).

Zdravila, ki vplivajo na sintezo proteinov delimo v 2 skupini, in sicer na inhibitorje 50S podenote in inhibitorje 30S podenote (Kohanski in sod., 2010).

Inhibitorji 50S ribosomske podenote so streptogramini, amfenikoli, oksazolidinoni, makrolidi (npr. eritromicin) in linkozamidi (npr. klindamicin). Delujejo tako, da fizično zavrejo iniciacijo translacije proteinov ali preprečijo translokacijo peptidil prenašalnih RNA molekul in s tem zavrejo peptidiltransferazno reakcijo, odgovorno za podaljšanje

nastajajoče peptidne verige. Linkozamidi in makrolidi preprečijo dostop peptidil prenašalnih RNA molekul do ribosoma, kar privede do preprečitve elongacijske reakcije s peptidiltransferazo in razpada peptidil prenašalne RNA (Kohanski in sod., 2010).

Makrolidi vsebujejo laktonski obroč vezan na sladkor. Zaradi pogostih variacij v laktonskem obroču in sladkorju, poznamo več makrolidnih antibiotikov. Najbolje poznan je eritromicin, ki ga proizvaja *Streptomyces erythreus*. Je širokospektralni antibiotik, ki je pogosto uporabljen namesto betalaktamskih antibiotikov, predvsem namesto penicilina pri katerem lahko prihaja do alergij. Deluje proti po Gramu pozitivnim kokom, mikoplazmam, klamidijam, rikecijam. Eritromicin se veže z ribosomskima podenotama 23S in 50S ter preprečuje translacijo (Slika 13). Med novejša makrolidna antibiotika sodi azitromicin, ki bolje prodira v tkiva (Madigan in sod., 2009; Kotnik, 2002).

Piranozidni antibiotiki oziroma linkozamidi so po delovanju zelo podobni makrolidom (Slika 13). Zanje je značilno, da se vežejo na enaka mesta ribosomov kot makrolidi. V tej skupini je pomemben antibiotik klindamicin, ki je kloriran derivat linkomicina in je od njega učinkovitejši (Kotnik, 2002).

Druga skupina zaviralcev proteinske sinteze so inhibitorji 30S ribosomske podenote, kot so npr. tetraciklini, ki preprečijo dostop aminoacil prenašalnih RNA molekul do ribosoma (Slika 13) (Kohanski in sod., 2010). So antibiotiki z zelo širokim spektrom delovanja, saj so dobro učinkoviti proti skoraj vsem po Gramu pozitivnim ter po Gramu negativnim bakterijam. Proizvajajo jih streptomicete. Zgrajeni so iz štirih linearno povezanih obročev, od tod tudi njihovo ime. Tudi pri tej skupini poznamo številne polsintetične derivate, ki jih je možno injicirati (Lancini in sod., 1995).

Makrolidi in tetraciklini so tipično bakteriostatični, pri določenih bakterijskih vrstah ali specifičnih načinih zdravljenja pa lahko postanejo baktericidni (Kohanski in sod., 2010).

Ureaplasma naravno odporne proti penicilinskim antibiotikom, ker nimajo celične stene, ki je osnovna tarča delovanja penicilinov (Kotnik, 2002).

Poleg naravne odpornosti, se pri bakterijah pojavlja tudi pridobljena odpornost proti antibiotikom. Za razliko od naravne odpornosti, ki se pojavlja pri posamezni bakterijski vrsti, se pridobljena odpornost pojavlja le pri določenih sevih znotraj posamezne vrste ali rodu. Pridobljena odpornost je sposobnost bakterij, da postanejo odporne na učinke antibiotikov za katere so bile sprva občutljive. Ker so bakterije tudi same sposobne proizvodnje antibiotikov, so morale razviti odpornostne mehanizme za nevtralizacijo ali uničenje proizvedenega antibiotika, če so želele preživeti. Tovrstna odpornost je lahko posledica mutacije kromosoma, ali pridobitve nove genetske informacije s plazmidom preko horizontalnih genskih prenosov med različnimi bakterijami. Tako se lahko zapisi za odpornost nahajajo na bakterijskem kromosomu ali plazmidu (Madigan in sod.; 2009, Kotnik, 2002).

Pri mikroorganizmih ločimo šest različnih načinov odpornosti za antibiotike:

- pomanjkanje strukture, ki jo antibiotik zavira (npr. mikoplazme nimajo celične stene, zato so naravno odporne proti penicilinu)
- mikroorganizmi naredijo membrano nepropustno za antibiotik, zato le ta ne more prodreti v celico (penicilin G in platensimicin ne moreta vstopiti v po Gramu negativne bakterije)
- mikroorganizmi lahko spremenijo antibiotik v neaktivno obliko (encim betalaktamaza lahko cepi betalaktamski obroč penicilinov in jih tako inaktivira)
- mikroorganizem lahko spremeni tarčo na katero deluje antibiotik
- sprememba presnovne poti na katero deluje antibiotik
- aktivno črpanje antibiotika iz celice (Madigan in sod., 2009; Kotnik, 2002)

Do razvoja bakterijske odpornosti za določene antibiotike prihaja zaradi bakterijske evolucije, ki jo poganja uporaba antibiotikov. Odporne bakterije se nato širijo z naravno selekcijo, saj antibiotiki ne zavrejo njihovega razmnoževanja, uničijo pa za določen antibiotik občutljive tekmece (Read in sod., 2014).

V zadnjih letih se stopnja odpornosti pri UM povečuje. Pri bakterijah *Ureaplasma* spp. prihaja do pridobljene odpornosti proti fluorokinolonom in makrolidom, pri *M. hominis* pa proti fluorokinolonom in linkozamidom, kot je klindamicin (CLSI, 2011).

Za UM je značilna tudi naravna odpornost proti betalaktamom in glikopeptidom (vankomicinu) zaradi odsotnosti celične stene. Čeprav zdravljenje večinoma poteka z makrolidi, je *M. hominis* naravno odporna proti makrolidom s 14 ogljikovimi atomi (eritromicin) ali s 15 ogljikovimi atomi (azitromicin) (Redelinghuys in sod., 2014). Znanstveniki domnevajo, da do takšne odpornosti najverjetneje pride zaradi zamenjave gvanina z adeninom na mestu 2057 (G2057A) v domeni V 23S rRNA podenote. Mutacija

povzroči spremembo strukture rRNA in s tem onemogoči vezavo makrolidov s 14 in 15 ogljikovimi atomi ter telitromicina na ribosom. Tudi dodatna mutacija z zamenjavo citozina z uracilom na mestu 2610 in domnevni mehanizem izčrpavanja antibiotika naj bi prispevala k naravni odpornosti *M. hominis* proti eritromicinu. Mutacij v domeni II 23S rRNA podenote in ribosomalnih proteinih L4 ter L22 znanstveniki do zdaj še niso odkrili (Pereyre in sod., 2006; Pereyre in sod., 2002).

Ureaplazme so naravno odporne proti linkozamidnim antibiotikom, na primer klindamicinu (Redelinghuys in sod., 2014). Čedalje pogostejše pa pri ureaplazmah prihaja tudi do odpornosti proti makrolidom, predvsem eritromicinu. Za nizko stopnjo odpornost ureaplazem proti makrolidom s 14 in 15 ogljikovimi atomi in verjetno tudi linkozamidom naj bi bila odgovorna gena *msrD* in *msrB*, ki kodirata proteine za aktivno izločanje antibiotika iz bakterijske celice. Kot možni mehanizem odpornosti proti makrolidom znanstveniki omenjajo točkovne mutacije v domeni V 23S rRNA ali mutacije v genih z zapisom za ribosomalni protein L4. Pri sevih ureaplazem odpornih proti eritromicinu so Xiao in sodelavci dokazali genetske spremembe v ribosomalnih proteinih L4 in L22 ter 23S rRNA. *In vitro* selekcioniranje ureaplazem je omogočilo odkritje točkovne mutacije A208C, ki povzroča spremembo aminokislinskega zaporedja v zanki ribosomalnega proteina L4, ter mutacije A2066G v 23S rRNA. Omenjeni mutaciji sta bili predhodno povezani z odpornostjo bakterij proti makrolidom, vendar ju pri naravnih izolatih ureaplazem še niso odkrili. Tudi insercije in delecije aminokislin (R66Q67) v zanki ribosomalnega proteina L4 bi lahko prispevale k odpornosti proti makrolidom. Na tem področju je potrebnih še veliko študij za natančno ugotovitev odpornostnih mehanizmov ureaplazem proti makrolidom in linkozamidom (Xiao in sod., 2011; Ponyai in sod., 2013; Lu in sod., 2010).

Pridobljena odpornost *M. hominis* in ureaplazem proti makrolidom, linkozamidom, streptograminom in ketolidom je zelo redka, saj se pri kliničnih izolatih pojavlja le pri majhnem številu primerov. V Italiji so pri ureaplazmah dokazali odpornost proti eritromicinu in azitromicinu v 15 %. V zadnjih letih so ugotovili porast v odpornosti UM proti eritromicinu na Kitajskem, zaradi pretirane uporabe makrolidnih antibiotikov (Pereyre in Pham., 2014; De Francesco, 2013). Tudi v Madžarski in v Južni Afriki so v zadnjih letih poročali o povišani odpornosti ureaplazem proti eritromicinu (okoli 80 %). V Turčiji so raziskovalci poročali celo o 100 % odpornosti *M. hominis* proti eritromicinu (Ponyai in sod., 2014; Redelinghuys in sod., 2014; Bayraktar in sod., 2010).

Odpornost proti tetraciklinom so pri *M. hominis* in *Ureaplasma* spp. dokumentirali že sredi leta 1980. Trenutno je edini znani mehanizem odpornosti molikotov proti tetraciklinom prisotnost mobilnega genetskega elementa *tetM*, ki sta ga pri ureaplazmah prvič opisala Roberts in Kenny, leta 1986. Gen *tetM* se nahaja na konjugativnem transpozonu Tn916 iz družine Tn1545. Iz različnih bakterij se lahko preko horizontalnih prenosov vnese v UM, kjer se nato vključi v njihov genom. Gen *tetM* kodira protein za vezavo na ribosome, ki

povzroči konformacijsko spremembo ribosoma in s tem prepreči vezavo tetraciklina nanj. Tako je ribosom zaščiten pred delovanjem antibiotika. O odpornosti ureaplazem proti tetraciklinu so poročali v Singapurju, Franciji in Veliki Britaniji (CLSI, 2011; Beeton in sod., 2009a; Govender in Chalkley, 2012; Bebear in Kempf, 2005). Pojavnost pridobljene odpornosti proti tetraciklinom pri ureaplazmah in *M. hominis* se od države do države razlikuje. Med leti 1999 in 2002 je bila v Franciji odpornost *M. hominis* proti tetraciklinu 19 %, pri ureaplazmah pa 2 %. Nizko stopnjo odpornosti ureaplazem proti tetraciklinom so ugotovili tudi v Veliki Britaniji, Kitajski, Madžarski in v Italiji, kjer je znašala manj kot 5 %. Prav tako so ugotovili, da je odpornost *M. hominis* nizka in znaša v omenjenih državah okoli 10 %. V Turčiji niso dokazali odpornosti UM proti tetraciklinu. Nasprotno pa so ugotovili, da je odpornost ureaplazem proti tetraciklinom v Ameriki in Južni Afriki dokaj visoka in znaša 45 % oziroma 73 %. (Ponyai in sod., 2013; Redelinghuys in sod., 2014; De Francesco in sod., 2013; Pereyre in Pharm, 2014; Bayraktar in sod., 2010).

Odpornost proti fluorokinolonom je pri UM redkeje dokazana, ker antibiotik deluje baktericidno. Sevi odporni proti kinolonom se pojavljajo predvsem pri imunsko oslabeledih osebah. Raziskovalci so poročali o pridobljeni odpornosti pri kliničnih izolatih bakterij *Ureaplasma* spp., kot tudi *M. hominis*. Osnovni tarči delovanja fluorokinolonskih antibiotikov sta bakterijska topoizomeraza IV in DNA giraza. Ločimo dva mehanizma, ki privedeta do odpornosti. Prvi mehanizem so mutacije v tarčnih genih *gyrA*, *gyrB*, *parC* in *parE*. Pri drugem mehanizmu pa pride do zmanjšanja akumulacije kinolona znotraj bakterijske celice zaradi aktivnega izčrpavanja antibiotika ali zmanjšane penetracije. Pri UM najpogostejše prihaja do visoke stopnje odpornosti zaradi mutacije pri zapisih za DNA girazo in topoizomerazo IV. Spremembe nastajajo v regijah za odpornost proti kinolonom (angl. quinolone resistance determining regions; QRDR) gena *gyrA* za girazo in genov *parC* ter *parE* za topoizomerazo IV. Odkrili so, da se točkovni mutaciji, ki povzročata zamenjavo serina na mestu 83 z levcinom pri genu *parC* (S83L) in zamenjavo aspargina na mestu 112 z glutaminsko kislino pri genu *gyrA* (D82N), pogosto pojavljata pri ureaplazmah, ki so odporne proti fluorokinolonom (Beeton in sod., 2009a; Bebear in Kempf, 2005).

Stopnja odpornosti UM proti fluorokinolonom ni znana, vendar je verjetno zelo nizka. V Franciji je leta 2000 znašala manj kot 1 % za bakterije *Ureaplasma* spp.. Ker pa se fluorokinoloni danes precej pogostejše uporabljajo, so tudi okužbe s sevi UM odpornimi proti fluorokinolonom pogostejše predvsem pri ljudeh, ki so bili predhodno zdravljeni z omenjeno skupino antibiotikov, ali pri imunsko oslabljenih osebah (Pereyre in Pharm, 2014). Predvsem v Kitajski od leta 2005 naprej ugotavljajo povišano stopnjo odpornosti proti fluorokinolonom (>50 %) pri ureaplazmah (Song in sod., 2014). Tudi v Južni Afriki je odpornost ureaplazem proti levofloksacinu dokaj visoka (40 %), podobno je v Italiji, kjer je bila ugotovljena odpornost ureaplazem proti ciprofloksacinu okoli 60 % (Redelinghuys in sod., 2014; De Francesco in sod., 2013).

2.1.7.4 Določanje občutljivosti urogenitalnih mikoplazem za antibiotike

Za določanje občutljivosti UM za antibiotike obstajajo na voljo različni komercialni testi, kot so Duo kit (Sanofi diagnostics Pasteur, France), Mycoview (Ivagen), MycoIST2 (BioMerieux) in Mycofast Revolution (ELITech Diagnostic, France), ki temeljijo na sposobnosti metabolizma uree pri ureaplazmah in arginina pri bakteriji *M. hominis*. Zaradi razgradnje substrata pride do spremembe pH in posledično spremembe barve tekočega gojišča, na podlagi česar lahko določimo ali gre za občutljiv oziroma odporen organizem (Redelinghuys in sod., 2013).

Clinical and laboratory standard institute (CLSI) pa je objavil smernice za testiranje občutljivosti UM za eritromicin, klindamicin, levofloksacin, moksifloksacin in tetraciklin z metodo mikrodilucije v tekočem gojišču. Tudi ta test temelji na sposobnosti metabolizma uree ali arginina pri UM in posledični spremembi pH ter barve tekočega gojišča. Za določitev občutljivosti ali odpornosti bakterije so določili kriterije za interpretacijo minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za ureaplazme in *M. hominis* (Preglednica 5 in Preglednica 6) (CLSI, 2011).

Preglednica 5: Kriteriji za interpretacijo minimalne inhibitorne koncentracije za bakterijo *Ureaplasma urealyticum* (CLSI, 2011).

Razred protimikrobnega sredstva	Protimikrobno sredstvo	MIK (µg/mL) interpretativni kriterij		
		S	I	R
Kinoloni	Levofloksacin	≤ 2	-	≥ 4
	Moksifloksacin	≤ 2	-	≥ 4
Tetraciklini	Tetraciklin	≤ 1	-	≥ 2
Makrolidi	Eritromicin	≤ 8	-	≥ 16

Legenda: S-občutljiv, I-srednje občutljiv, R-odporen.

Preglednica 6: Kriteriji za interpretacijo minimalne inhibitorne koncentracije za bakterijo *M. hominis* (CLSI, 2011).

Razred protimikrobnega sredstva	Protimikrobno sredstvo	MIK (µg/mL) interpretativni kriterij		
		S	I	R
Kinoloni	Levofloksacin	≤ 1	-	≥ 2
	Moksifloksacin	≤ 0,25	-	≥ 0,5
Tetraciklini	Tetraciklin	≤ 4	-	≥ 8
Linkozamidi	Klindamicin	≤ 0,25	-	≥ 0,5

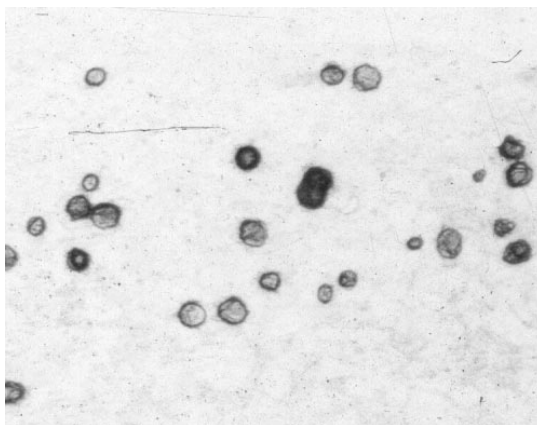
Legenda: S-občutljiv, I-srednje občutljiv, R-odporen.

2.1.8 Laboratorijska diagnostika

2.1.8.1 Izolacija in gojenje urogenitalnih mikoplazem

UM lahko izoliramo iz brisov sečnice, prvega curka jutranjega urina, sperme, izločkov prostate, maternično-nožničnih brisov, iz biopsije endometrija, iz amnijske tekočine in placente. Lahko jih dokažemo tudi v cerebrospinalni tekočini, sinovialni tekočini, krvi ali biopsijskem vzorcu. Po odvzemu kužnine brise vstavimo v primerno transportno gojišče, s čimer preprečimo propad UM. Nato kužnine v transportnem gojišču čim hitreje prenesemo do laboratorija. Če bakterij ne moremo gojiti takoj, shranimo kužnino pri 4 °C za največ 48 ur. Po 48 urah pa je potrebno vzorce shraniti pri -70 °C ali v tekočem dušiku (Bebear in sod., 2006).

Izolacija mikoplazem je standardna metoda za dokaz okužbe z *M. hominis* in *Ureaplasma* spp., vendar zahteva specifična kompleksna gojišča in usposobljeno osebje. Zaradi narave UM, ki so občutljive za okoljske vplive, je predvsem potrebna posebna pozornost pri odvzemu vzorca, obvezna je uporaba transportnega gojišča ter hiter in ustrezen transport do samega laboratorija. Rezultati so navadno znani v dveh do petih dneh. S to metodo lahko ureaplazme uspešno identificiramo do rodu glede na njihovo značilno obliko granuliranih kolonij (Slika 14) in proizvodnjo ureaze (Waites in sod., 2012a).



Slika 14: Kolonije bakterije *Ureaplasma* spp. po 48 urni inkubaciji na trdnem gojišču A8 (Waites, 2005).

Mycoplasma hominis tvori na trdnem gojišču A8 ali SP4 značilne kolonije podobne obliki »pečenega jajca« (Slika 15). Njena posebnost je sposobnost hidrolize arginina, vendar je potrebno za popolno identifikacijo izvesti še test inducirane rastne inhibicije s homolognim antiserumom, imunoblot z monoklonskimi protitelesi, epi-imunofluorescenco ali PCR (Waites in sod., 2012a).



Slika 15: Kolonije bakterije *M. hominis* na trdnem A8 gojišču po 72 urni inkubaciji (Waites, 2005).

2.1.8.2 Molekularne metode

V zadnjih letih se za dokazovanje izven genitalnih okužb z mikoplazmo in ureaplazmo predvsem uporablja metoda PCR, ki poleg višje občutljivosti omogoča tudi ločevanje med posameznimi vrstami ureaplazem. Tarče molekularnih testov za dokazovanje ureaplazem so večinoma ureazni gen, gen 16S rRNA in MB antigen, medtem ko se kot tarčni gen za dokazovanje *M. hominis* uporablja 16S rRNA in ribosomalno DNA (Waites in sod., 2012a).

Prednost metode PCR pred gojenjem je ta, da je metoda hitra, rezultati so na voljo že v enem dnevu in je visoko specifična. Najpogostejše se za dokaz UM uporablja metoda multipleks PCR in metoda PCR v realnem času, s katerima lahko kvantificiramo in karakteriziramo ureaplazme do vrste. Razvoj in uporaba molekularnih metod v zadnjih dveh desetletjih sta močno izboljšala dokazovanje in identifikacijo UM v kliničnih vzorcih. Diagnoza je tako danes z uporabo novejših metod veliko hitrejša in bolj natančna. Čeprav je metoda PCR bolj občutljiva za dokazovanje bakterij *M. hominis* in *Ureaplasma* spp. kot gojenje, slednja v večini laboratorijev še vedno ostaja najbolj ekonomična in praktična izbira (Waites in sod., 2012a).

2.1.8.3 Serološki testi

Zanimanje za razvoj seroloških testov za dokazovanje imunskega odziva gostitelja na navzočnost UM narašča, vendar so okužbe lokalizirane v urogenitalnem traktu, zato je protitelesni imunski odziv gostitelja zmanjšan. Serološki testi, kot so mikroimunofluorescenca, zaviranje metabolizma in encimsko-immunski testi za dokazovanje okužb z bakterijami *M. hominis* in *Ureaplasma* spp., se uporabljajo predvsem v raziskovalne namene. Testi še niso standardizirani in komercialno dostopni, zato se redkeje

uporabljajo v laboratorijski diagnostiki. Na tem področju so potrebne še številne primerjalne študije, ki bi nam pojasnile vrednost dokazovanja protitelesnega odziva (Waites in sod., 2012a).

2.1.8.4 Hitri diagnostični testi

Zaradi težav pri diagnostiki mikoplazem s konvencionalnimi metodami je potrebno najti bolj občutljive, zanesljive in hitrejše alternative. Za identifikacijo mikoplazem so na voljo fenotipske in genotipske metode. Zlati standard še vedno predstavlja kultura, vendar ima v primerjavi z metodo PCR nizko občutljivost in je zaradi uporabe obogatitvenih gojišč tudi bolj zamudna. Ravno zaradi teh pomanjkljivosti je pomemben razvoj komercialno dostopnih diagnostičnih testov, ki temeljijo na tekočih gojiščih in so enostavnejši, hitrejši ter cenovno ugodnejši. Danes obstaja več različic komercialno dostopnih hitrih diagnostičnih testov za dokazovanje in določanje občutljivosti UM za posamezne antibiotike, kot so Duo kit (Sanofi diagnostics Pasteur, France), Mycoview (Ivagen) in MycoIST2 (BioMerieux) (Redlinghuys in sod., 2013).

Eden iz med novejših komercialno dostopnih testov je komplet reagentov Mycofast Revolution (ELITech Diagnostic, France), ki omogoča enostavno identifikacijo in kvantifikacijo *M. hominis* in bakterij *Ureaplasma* spp. v 24 do 48 urah. Temelji na sposobnosti metabolizma uree pri bakterijah *Ureaplasma* spp. in arginina pri *M. hominis* v tekočem gojišču (Redlinghuys in sod., 2013).

Testna ploščica vsebuje 20 vdolbinic z rastnim gojiščem iz konjskega seruma, kvasnega ekstrakta, cisteina, arginina, uree, fenol rdeče in antibiotikov. V vdolbinicah za identifikacijo *M. hominis* je prisoten eritromicin, ki zavre rast bakterij rodu *Ureaplasma* spp., v vdolbinicah za rast *Ureaplasma* spp. pa je prisoten linkomicin, ki zavre rast *M. hominis*. Poleg dela ploščice za presejalno določanje navzočnosti UM, je del ploščice namenjen tudi za določanje občutljivosti UM za eritromicin, klindamicin, levofloksacin, moksifloksacin in tetraciklin. Oba dela testne ploščice omogočata dokazovanje UM s koncentracijo $\leq 10^3$ CCU/mL (število kolonij, ki povzročijo spremembo barve) ter $>10^3$ CCU/mL, ki predstavlja koncentracijo bakterij s patogeno vlogo. Zaradi mikoplazemske razgradnje substrata, uree ali arginina, pride do spremembe pH in posledično se spremeni barva tekočega gojišča. Kompletu reagentov je priloženo tudi ustrezno univerzalno transportno gojišče za mikoplazme (UMMt) in rastni suplement za izboljšano rast *M. hominis* (Redlinghuys in sod., 2013).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije in reagenti

- Mycoplasma broth base (Oxoid, Velika Britanija)
- Urea (Kemika, Hrvaška)
- Bacto™ Yeast extract (BD, ZDA)
- Phenol red sodium salt (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Mélange PolyVitest™ (PVX-M) (BioMérieux, Francija)
- Horse serum (Gibco-Life technologies, ZDA)
- L-Cysteine (Merck, Nemčija)
- L-Arginine (Difco, ZDA)
- Trypticase soy broth (BD, Francija)
- Yeast extract (BD, Francija)
- Putrescine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, ZDA)
- CaCl₂ dihydride (Merck, Nemčija)
- Agar (Merck, Nemčija)
- Konjski serum (Invitrogen-Life technologies, ZDA)
- Glycyl-L-histidyl-L-lysine acetat (GHL) tripeptid solution (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Penicilin G (Panpharma, Francija)
- Amphotericine B (Myers Squibb, ZDA)
- Polymixin B sulfat (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Voriconazole (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Tetracycline (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Levofloxacin (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Erythromycin (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Clindamycin hydrochloride (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Moxifloxacin hydrochloride (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Mycofast Revolution (ELITech, Francija)

3.1.2 Drobni laboratorijski material

- avtomatske pipete Eppendorf Research 100, 200, 1000 (Eppendorf, Nemčija) in
- Finnpiquette 100, 200 (ThermoFisher Scientific, ZDA)
- multikanalna avtomatska pipeta BIOHIT mLine 200 (Sartorius, Nemčija)
- nastavki s filtri za avtomatske pipete Neptune barrier tips 100, 200 in 1000XL (CLP, ZDA)
- steklene epruvete 10 mL (Assistent OMV, Nemčija)
- steklene epruvete z navojem 5 mL (BD, ZDA)
- centrifugirne tubice z okroglim dnom 15 mL (TPP, Švica)
- kriotubice Cryo Vials 1,5 mL (STARLAB, UK)
- mikrotitrne ploščice Micro Test plate 96 wells U (SARSTED, Nemčija)
- plastične petrijevke $\phi=55$ mm (Brand, Nemčija)

3.1.3 Laboratorijska oprema

- hladilnik (Gorenje, Slovenija)
- zamrzovalnik z -80°C (SANYO, Japonska)
- inkubator (Heraeus, Nemčija)
- stereomikroskop SMZ 800 (Nikon, Japonska)
- sterilna komora (ISKRA PIO, Slovenija)

3.1.4 Bakterijske vrste oziroma klinični vzorci

V magistrsko nalogo smo vključili 111 brisov sečnice in/ali materničnega vratu bolnikov z dokazano okužbo z ureaplazmami, *U. urealyticum* in/ali *U. parvum*, ali z *M. hominis* z metodo PCR. Kužnine bolnikov so bile odvzete v Univerzitetnem Kliničnem Centru Ljubljana, na Infekcijski kliniki, v letih 2013 in 2014. Brisi so bili vstavljeni v univerzalno UMMt transportno gojišče in shranjeni v zamrzovalniku pri -80°C . V vseh vzorcih so v Laboratoriju za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami inštituta za Mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete predhodno dokazali navzočnost DNA *M. hominis*, *U. parvum* ali *U. urealyticum*.

3.1.5 Gojišča za izolacijo urogenitalnih mikoplazem

Za ugotavljanje občutljivosti ureaplazem in *M. hominis* za antibiotike smo uporabili komplet reagentov Mycofast Revolution in metodo mikrodilucije povzeto po standardu CLSI. Iz 111 izhodnih urogenitalnih kužnin bolnikov smo uspešno izolirali ureaplazme v tekočem gojišču 10B in *M. hominis* v tekočem gojišču za mikoplazme. Vse uspešno izolirane bakterije iz tekočih gojišč smo nato nacepili na trdno gojišče A8 in jih po končani anaerobni inkubaciji kvantificirali tako, da smo kolonije prešteli in izračunali CFU/mL.

3.1.5.1 Priprava tekočega gojišča 10B z ureo za rast ureaplazem

Na oddelku za pripravo gojišč in reagentov so pripravili tekoče gojišče 10B z ureo. V ta namen so za 1 L tekočega gojišča 10B v 688 mL dvakrat destilirane vode (ddH₂O) raztopili 14 g osnove za tekoče gojišče za mikoplazme brez kristal vijoličnega z 1 mL sveže pripravljenega 1 % fenol rdeče. Z dodatkom 2N HCl so uravnali pH na 5,5 in gojišče avtoklavirali 15 min pri 121 °C. Nato so ga ohladili na sobno temperaturo in dodali 200 mL sterilnega konjskega seruma, 4 mL sterilne 10 % uree, 2,5 mL sterilnega 4 % L-cisteina, 100 mL sterilnega 25 % kvasnega ekstrakta ter 5 mL sterilnega Iso Vitalex-a. Za preprečitev rasti drugih mikroorganizmov so dodali amfotericin in ampicilin. Ponovno so uravnali pH z dodatkom 8N HCl na 6,0 in gojišče shranili v temi pri 2-8 °C za največ 1 mesec.

3.1.5.2 Priprava tekočega gojišča za rast *Mycoplasma hominis*

Tudi tekoče gojišče za mikoplazme so pripravili na oddelku za pripravo gojišč in reagentov in sicer so za pripravo 1 L tekočega gojišča za mikoplazme v 788 mL ddH₂O raztopili 20 g osnove za gojišče za mikoplazme brez kristal vijoličnega in 2 mL sveže pripravljenega 1 % fenol rdečega. Nato so gojišče avtoklavirali 15 min pri 121 °C in ga ohladili na sobno temperaturo pred dodatkom 200 mL sterilnega konjskega seruma ter 10 mL sterilnega 50 % arginina. Za preprečitev rasti drugih mikroorganizmov so v gojišče dodali amfotericin, ampicilin, polimiksin (128 mg/mL) in vorikonazol (256 mg/mL). S pomočjo 8N NaOH so uravnali pH na 7,2-7,4. Tako pripravljeno gojišče so shranili pri 2-8 °C za največ 1 mesec.

3.1.5.3 Priprava trdnega gojišča A8 za rast urogenitalnih mikoplazem

Na oddelku za pripravo gojišč in reagentov so za pripravo 1 L gojišča zmešali 825 mL dH₂O, 24 g triptikaza sojinega tekočega gojišča, 2 g kvasnega ekstrakta, 1,7 g putrescin

dihidroklorida, 0,15 g kalcijevega klorid dihidrida raztopljenega v 1 mL vode in 10,5 g Select agarja. Z 1N HCl so uravnali pH na 5,5 in gojišče avtoklavirali 15 min pri 121 °C. Nato so gojišče ohladili na 45-50 °C. Po ohladitvi so dodali 200 mL konjskega seruma, 5 mL Iso Vitalex-a, 10 mL 10 % uree, 1 mL glicil-L-histidil-L-lizin acetata v tripeptidni raztopini, 5 mL 2 % L-cisteina, amfotericin in ampicilin. Z 8N HCl so ponovno uravnali pH na 6,0. Po 20 mL gojišča so vlili v vsako petrijevko, ki so jih po 2h urah obrnili in inkubirali pri sobni temperaturi čez noč. Gojišča so shranili v plastičnih vrečkah pri 2-8 °C v temi in jih porabili v 72 urah.

3.1.6 Priprava založnih raztopin antibiotikov

Vse potrebne založne raztopine antibiotikov so nam pripravili na oddelku za pripravo gojišč in reagentov. V ta namen so standardne antibiotike v praškasti obliki raztopili v ustreznem topilu. Za raztapljanje klindamicina, levofloksacina, moksifloksacina in tetraciklina so uporabili vodo, za raztapljanje eritromicina pa etanol.

Za testiranje občutljivosti *M. hominis* za antibiotike so pripravili antibiotike v sledečih založnih raztopinah:

- Klindamicin 32 µg/µL
- Levofloksacin 128 µg/µL
- Moksifloksacin 32 µg/µL
- Tetraciklin 512 µg/µL

Za testiranje občutljivosti *Ureaplasma* spp. so pripravili antibiotike v sledečih založnih raztopinah:

- Eritromicin 512 µg/µL
- Levofloksacin 256 µg/µL
- Moksifloksacin 256 µg/µL
- Tetraciklin 128 µg/µL

Ker eritromicin v etanolu ni dolgo obstojen, smo 3000 µL založne raztopine eritromicina prenesli v 3000 µL svežega tekočega gojišča 10B in tako zmanjšali vpliv etanola ter antibiotiku podaljšali obstojnost.

Izračun:

$$V_2 = 30 \mu\text{L} \times 200 \text{ luknjic} = 6000 \mu\text{L}$$

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$C_1 = 512 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = (256 \mu\text{g/mL} \times 6000 \mu\text{L}) / 512 \mu\text{g/mL}$$

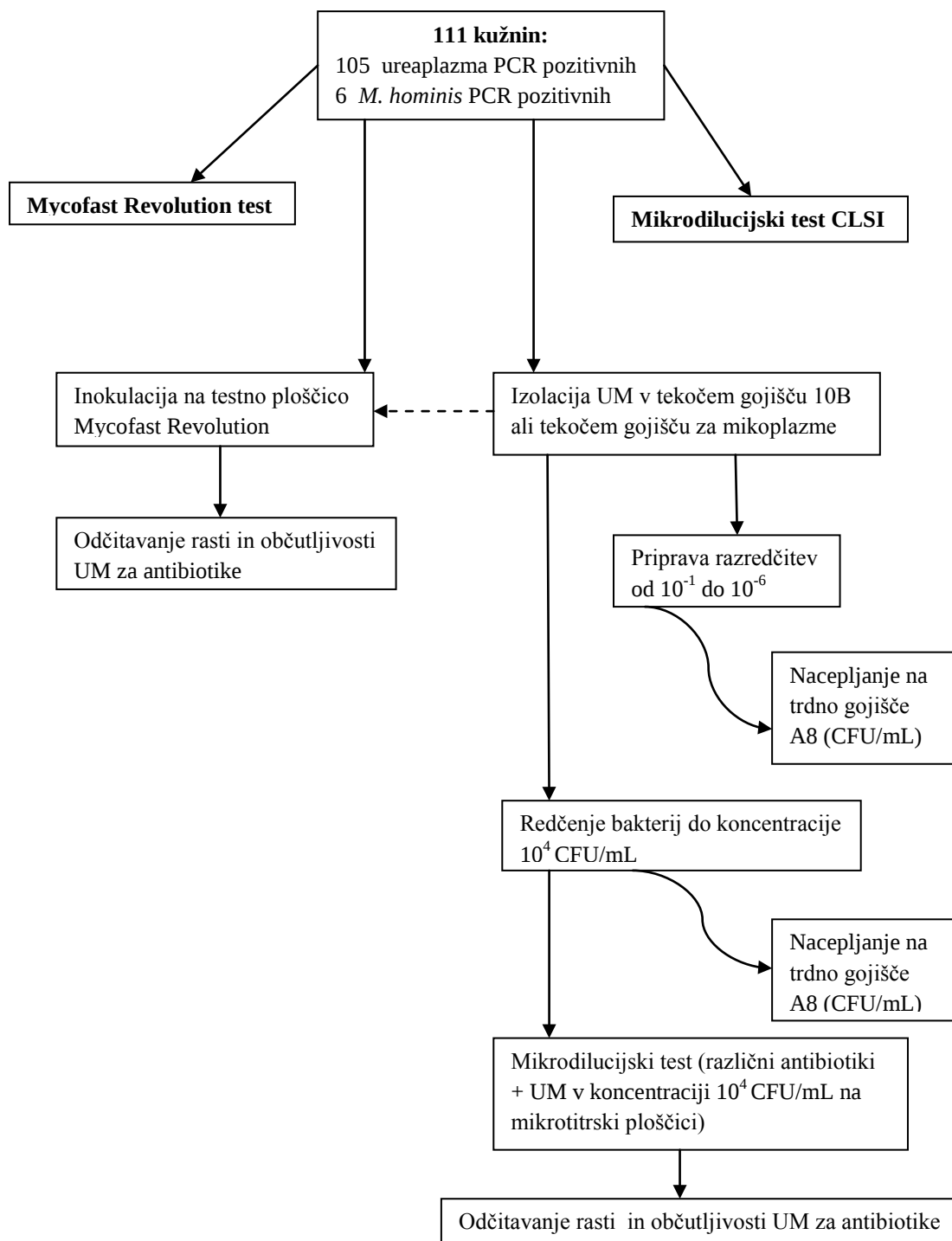
$$C_2 = 256 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 3000 \mu\text{L} \quad (\text{do } 6000 \mu\text{L} \text{ dopolnimo s } 3000 \mu\text{L} \text{ svežega tekočega gojišča 10B})$$

3.2 METODE

V tem magistrskem delu smo skušali ugotoviti ali je na območju Slovenije že prišlo do pojava odpornosti proti antibiotikom, ki se uporabljajo za zdravljenje urogenitalnih okužb. V ta namen smo testirali 111 izolatov UM iz kužnin bolnikov.

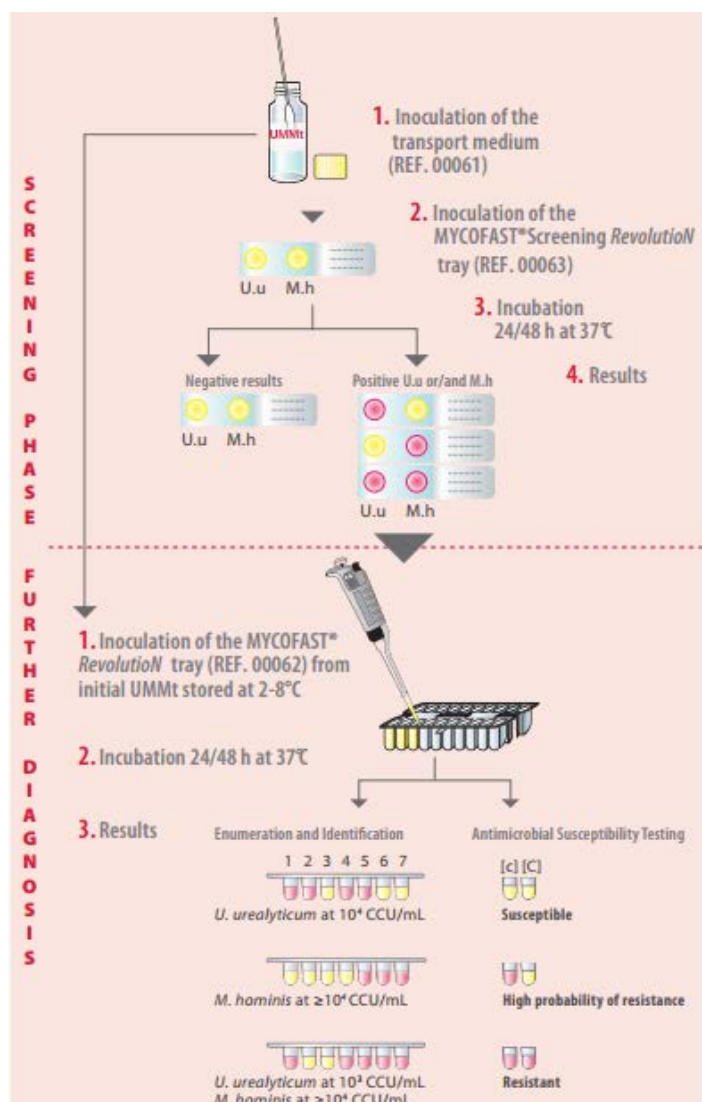
- Za določanje občutljivosti UM za eritromicin, klindamicin, levofloksacin, moksifloksacin in tetraciklin smo morali UM iz 111 urogenitalnih kužnin bolnikov (bris materničnega vratu in/ali sečnice) izolirati v ustreznem tekočem gojišču. Ureaplazme smo izolirali v tekočem gojišču 10B, medtem ko smo *M. hominis* izolirali v tekočem gojišču za mikoplazme.
- Tekoča gojišča z izoliranimi UM smo nato nacepili na trdna gojišča A8 in bakterije po inkubaciji prešteli ter določili CFU/mL.
- Za ugotavljanje občutljivosti organizmov za antibiotike smo UM v tekočih gojiščih ustrezno redčili do koncentracije 10^3 oziroma 10^4 CFU/mL.
- Občutljivost bakterij za antibiotike smo ugotavljali z metodo kompleta reagentov Mycofast Revolution, nato pa še z metodo mikrodilucije povzete po standardu CLSI (Slika 16). Po končanem testiranju smo 111 kužnin in vsa tekoča gojišča z izoliranimi bakterijami ustrezno shranili.



Slika 16: Shema poteka dela

3.2.1 Ugotavljanje občutljivosti urogenitalnih mikoplazem za antibiotike s kompletom reagentov

Test ugotavljanja občutljivosti UM za antibiotike smo izvedli po navodilih proizvajalca (Mycofast RevolutionN Screening method, ELITech, Francija) (Slika 17).



Slika 17: Potek izvedbe metode Mycofast RevolutionN (ELITechGroup, 2015b)

Zamrznjeno kužnino bolnika, ki je vsebovala bakterije *Ureaplasma* spp. ali *M. hominis* smo odmrznili, premešali in po 100 µL inokulirali v 20 vdolbinic na testni ploščici. Vdolbinice za rast *M. hominis* so vsebovale rastno gojišče iz konjskega seruma, kvasnega ekstrakta, cisteina, arginina, fenol rdeče in eritromicina, v vdolbinicah za rast ureaplazem pa je bila namesto arginina dodana urea ter namesto eritromicina antibiotik linkomicin. Nato smo v vdolbinice z gojiščem za rast *M. hominis* dodali še 50 µL rastnega suplementa in dobro premešali. Del testne ploščice je omogočal določanje občutljivosti UM za

eritromicin, levofloksacin, klindamicin, moksifloksacin in tetraciklin, drugi del ploščice pa je bil namenjen za presejalno določanje navzočnosti in okvirnega števila UM v mL kužnine (Slika 18). V vse vdolbinice smo dodali po dve kapljici mineralnega olja za preprečitev izhlapevanja in ploščice zaprli s pokrovom na katerem smo označili podatke o bolniku in datum izvedbe testa.

Sledila je inkubacija 24-72 h v inkubatorju pri temperaturi 37 °C. Po inkubaciji smo opazovali morebitno spremembo barve rastnega gojišča iz rumene v oranžno ali rdečo, kar je nakazovalo na razmnoževanje bakterij. Nato smo odčitali občutljivost UM za antibiotike (Preglednica 7 in Preglednica 8).

Preglednica 7: Mejne koncentracije antibiotikov, ki nakazujejo na občutljivost oziroma odpornost ureaplazem (Redelinghuys in sod., 2013).

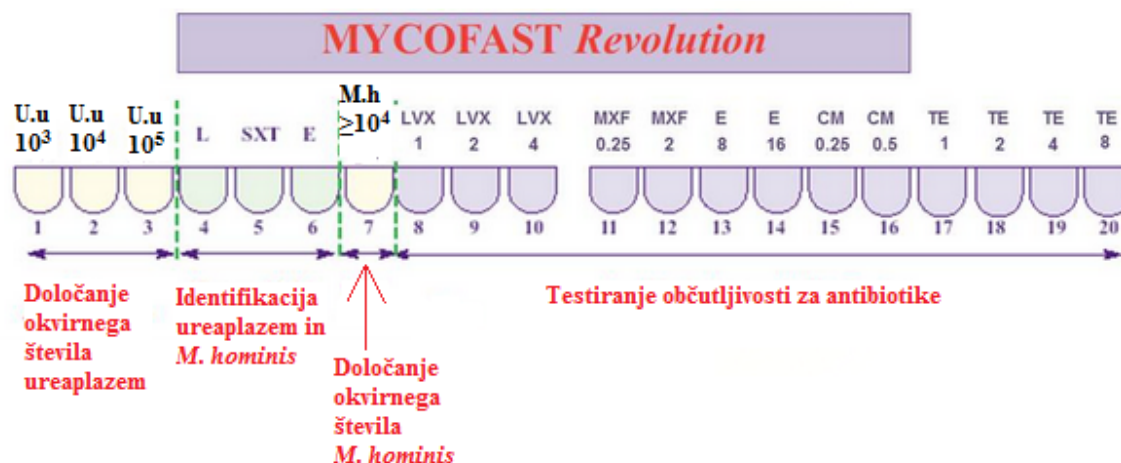
Antibiotik	Mjerne koncentracije antibiotikov (µg/mL)	
	S	R
Levofloksacin	≤ 2	≥ 4
Moksifloksacin	≤ 2	/
Tetraciklin	≤ 1	≥ 2
Eritromicin	≤ 8	≥ 16

Legenda: S-občutljiv, R-odporen.

Preglednica 8: Mejne koncentracije antibiotikov, ki nakazujejo na občutljivost oziroma odpornost *M. hominis* (Redelinghuys in sod., 2013).

Antibiotik	Mjerne koncentracije antibiotikov (µg/mL)	
	S	R
Levofloksacin	≤ 1	≥ 2
Moksifloksacin	≤ 0,25	/
Tetraciklin	≤ 4	≥ 8
Klindamicin	≤ 0,25	≥ 0,5

Legenda: S-občutljiv, R-odporen.



Slika 18: Testna ploščica za ugotavljanje občutljivosti UM z metodo kompleta reagentov Mycofast Revolution (ELITechGroup, 2015b).

Če je bila koncentracija bakterij prevelika, $>10^5$ CFU/mL, smo namesto bolnikove kužnine uporabili bakterije izolirane v tekočem gojišču 10B ali gojišču za mikoplazme, ki smo jih nato redčili s transportnim gojiščem UMMt, da smo dobili primerno koncentracijo 10^3 ali 10^4 CFU/mL. Nato smo ponovili zgoraj opisan postopek določanja občutljivosti UM za antibiotike z metodo kompleta reagentov Mycofast Revolution (ELITech, Francija).

3.2.2 Ugotavljanje občutljivosti urogenitalnih mikoplazem za antibiotike po metodi CLSI

3.2.2.1 Izolacija urogenitalnih mikoplazem v tekočem gojišču

Kužnine bolnikov smo nacepili v primerna tekoča gojišča, in sicer kužnine bolnikov s PCR dokazano okužbo z ureaplazmami v tekoče gojišče 10B, s PCR dokazano okužbo z *M. hominis* pa v tekoče gojišče za mikoplazme. V obeh primerih smo najprej nacepili po 100 μ L vzorca v 900 μ L ustreznega sveže pripravljenega gojišča v epruveti in inkubirali v inkubatorju pri 37 °C, 24 do 72 ur. Pri vzorcih kjer so ureaplazme zrasle v tekočih gojiščih, na trdnem gojišču pa ne, smo nacepili 200 μ L kužnine v 1800 μ L svežega tekočega gojišča 10B in ponovno inkubirali pri 37 °C, 24 do 72 ur.

Devet naključno izbranih vzorcev ureaplazem nagojenih v tekočem gojišču 10B smo preverili tudi z metodo PCR, da bi ugotovili ali je prišlo do obarvanja gojišča dejansko zaradi rasti bakterij *Ureaplasma* spp. ali morda zaradi kontaminacije gojišča.

3.2.2.2 Izolacija urogenitalnih mikoplazem na trdnem gojišču A8

Ko so se UM v tekočih gojiščih namnožile in zaradi svojega metabolizma povzročile spremembo pH in s tem spremembo barve gojišča, smo po 20 μ L tekočega gojišča 10B z izoliranimi ureaplazmami in po 50 μ L tekočega gojišča za mikoplazme z izolirano *M. hominis* nacepili na trdno gojišče A8 in inkubirali 24 do 72 ur v anaerobnem loncu pri 37 °C. Enako smo naredili tudi z vzorci tekočega gojišča za mikoplazme, kjer ni prišlo do spremembe barve gojišča. Pri vzorcih, ki niso zrasli na trdnem gojišču A8 smo inokulum tekočega gojišča povečali na 100 μ L ali pa smo na ploščo nacepili osnovno kužnino in ponovno inkubirali. Po inkubaciji smo vsa trdna gojišča A8 pregledali pod stereomikroskopom in tako preverili rast UM v čistih kulturah. Ureaplazme so zrasle v okroglih granuliranih kolonijah v obliki »morskega ježka«, mikoplazme pa v kolonijah podobnih obliki »pečenega jajca«.

3.2.2.3 Kvantifikacija urogenitalnih mikoplazem

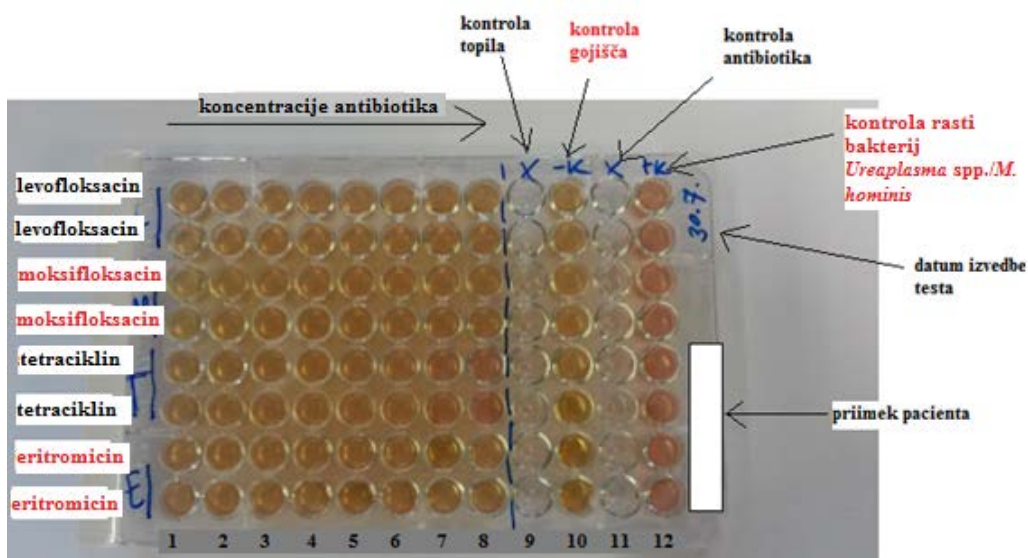
Po preverjanju čistosti kultur UM smo po standardu CLSI vse vzorce redčili od 10^{-1} do 10^{-6} tako, da smo v 1,5 mL mikrotubice odpipetirali po 90 μ L svežega tekočega gojišča 10B ali gojišča za mikoplazme. Nato smo v prvo mikrotubico odpipetirali 10 μ L ureaplazem rastočih v tekočem gojišču 10B ali 10 μ L *M. hominis* rastoče v tekočem gojišču za mikoplazme, dobro premešali in prenašali po 10 μ L v naslednje mikrotubice. Ploščo s trdnim A8 gojiščem smo primerno označili in jo razdelili na 6 delov. V vsak ločen predel smo inokulirali po 20 μ L posamezne redčitve in inkubirali 24 do 72 ur v anaerobnem loncu pri 37 °C, preostanek vzorca pa smo shranili pri -80 °C. Če po 14-ih dneh ni prišlo do rasti bakterij, smo na ploščo nacepili po 50 μ L oz. 100 μ L določene razredčine in inkubirali 24 h do 72 h v anaerobnem loncu pri 37 °C. Značilne kolonije smo prešteli pod stereomikroskopom pri števnici razredčitvi s 30-300 kolonijami in določili CFU/mL. Tako smo vzorce kvantificirali in določili primerno redčitev za določanje občutljivosti bakterij za antibiotike s pomočjo mikrodilucijske metode.

3.2.2.4 Mikrodilucijski test

Pri izvedbi metode mikrodilucije po standardu CLSI je pomembno, da uporabimo primerno tekoče gojišče, in sicer za *M. hominis* tekoče gojišče za mikoplazme z dodanim argininom, vendar brez polimiksina in vorikonazola, ker je takšno gojišče bolj bistro. Za bakterije *Ureaplasma* spp. pa se uporablja tekoče gojišče 10B z dodano ureo. Pred izvedbo mikrodilucije smo morali UM iz kužnin bolnikov najprej nagojiti v tekočih gojiščih, saj zaradi svoje majhnosti ne povzročajo turbidnosti. Nato smo jih natančno kvantificirali oziroma določili koncentracijo bakterij (CFU/mL) z metodo štetja na plošči. Bakterije

izolirane v tekočih gojiščih smo glede na koncentracijo CFU/mL primerno razredčili z novim, sveže pripravljenim tekočim gojiščem 10B ali gojiščem za mikoplazme in s tem umerili koncentracijo UM na 10^4 CFU/mL. Tako pripravljen vzorec imenovan MIK inokulum smo pred izvedbo mikrodilucije inkubirali pri 37 °C dve uri za *M. hominis* in eno uro za ureaplazme. V tem času so postale bakterije metabolno aktivne. Po 20 µL aktivnega inokuluma smo nacepili na trdno gojišče A8, inkubirali v anaerobnem loncu pri 37 °C, 24-72 h. Kolonije UM smo nato prešteli pod stereomikroskopom pri števnih redčitvah in določili CFU/mL ter tako preverili, ali je bila redčitev res ustrezna. Preostali del MIK inokuluma smo uporabili za izvedbo mikrodilucije.

Pri mikrodilucijskem testu smo najprej testno ploščico s 96 vdolbinicami označili z imenom bolnika, datumom, in testiranimi koncentracijami antibiotikov ter kontrolami. Na vsaki ploščici smo testirali po štiri antibiotike v dveh ponovitvah tako, da se je nahajal antibiotik 1 v vrstici A in B, antibiotik 2 v vrstici C in D, antibiotik 3 v vrstici E in F ter antibiotik 4 v vrstici G in H. Vdolbinice od 1 do 8 smo uporabili za določanje MIK, vdolbinica 9 je namenjena kontroli topila, če antibiotik ni bil raztopljen v vodi, vdolbinica 10 kontroli gojišča, vdolbinica 11 kontrola antibiotika in vdolbinica 12 kontroli rasti (Slika 19).



Slika 19: Prikaz mikrodilucijske ploščice.

Kakšno založno raztopino posameznega antibiotika potrebujemo za izvedbo mikrodilucije smo določili na podlagi kriterijev za interpretacijo MIK posameznega antibiotika za *M. hominis* in *Ureaplasma urealyticum* tako, da smo določili štiri koncentracije nižje od mejne vrednosti za občutljivost bakterije za določen antibiotik in štiri koncentracije višje od mejne vrednosti za odpornost bakterije proti določenemu antibiotiku (Preglednica 9 in Preglednica 10).

Preglednica 9: Izbira primernih koncentracij antibiotikov za testiranje občutljivosti bakterije *M. hominis* za antibiotike z metodo mikrodilucije.

Antibiotik	Mejna vrednost (µg/mL)	Koncentracija antibiotika (µg/mL)							
Levofloksacin	1-2	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16
Moksifloksacin	0,25-0,5	0,032	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4
Tetraciklin	4-8	0,5	1	2	4	8	16	32	64
Klindamicin	0,25-0,5	0,32	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4

Preglednica 10: Izbira primernih koncentracij antibiotikov za testiranje občutljivosti bakterij *Ureaplasma* spp. za antibiotike z metodo mikrodilucije.

Antibiotik	Mejna vrednost (µg/mL)	Koncentracija antibiotika (µg/mL)							
Levofloksacin	2-4	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
Moksifloksacin	2-4	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
Tetraciklin	1-2	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16
Eritromicin	8-16	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32

Za vsak antibiotik smo v vdolbinice od 2 do 8, v 10 in v 12 odpipetirali po 25 µL tekočega gojišča 10B ali tekočega gojišča za mikoplazme, v vdolbinice 1, 2 in 11 po 25 µL najvišje koncentracije oz. založne raztopine testiranega antibiotika. Enako smo naredili za vse ostale antibiotike v naslednjih vrsticah. Nato smo pripravili dvojne razredčine antibiotika tako, da smo z multikanalno pipeto prenašali po 25 µL antibiotika v smeri od vdolbinice 2 do vdolbinice 8 in vmes dobro premešali. Zadnjih 25 µL iz vdolbinice 8 smo zavrgli.

Vdolbinico 9 za kontrolo topila smo pri vseh antibiotikih pustili prazno, saj kontrola za antibiotike raztopljene v vodi oziroma v tekočem 10B gojišču (eritromicin) ni bila potrebna. Po 175 µL primerno razredčenih UM v tekočem gojišču 10B ali gojišču za mikoplazme smo dodali v vdolbinice od 1 do 8 in v 12 (kontrola rasti), v vdolbinico 10 in 11 pa 175 µL neinokuliranega tekočega gojišča 10B ali gojišča za mikoplazme in vse skupaj dobro premešali (Slika 20 in Slika 21). Vse vdolbinice smo prekrili z mineralnim oljem, da smo preprečili izhlapevanje. Ploščice smo inkubirali v inkubatorju pri 37 °C v aerobnih pogojih, po 18-24 h preverili rast in nato vsakodnevno spremljali ali je v vdolbinici za kontrolo rasti že prišlo do spremembe barve iz rumene v rožnato kadar smo testirali ureaplazme oziroma v temnejše rdečo kadar smo testirali *M. hominis*. Ko smo v

kontrolnih vdolbinicah vrstice 12 opazili rast UM, smo takoj odčitali MIK, ki predstavlja najvišjo razredčino antibiotika pri kateri ne pride do rasti oziroma spremembe barve.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Levofloksacin 16 (µg/ml)	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	X	Kontrola ravnega gojišča	Kontrola antibiotika	Kontrola rasti v gojišču brez antibiotika
B	Levofloksacin 16 (µg/ml)	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125				
C	Moksifloksacin 4 (µg/ml)	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,032				
D	Moksifloksacin 4 (µg/ml)	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,032				
E	Tetraciklin 64 (µg/ml)	32	16	8	4	2	1	0,5				
F	Tetraciklin 64 (µg/ml)	32	16	8	4	2	1	0,5				
G	Klindamicin 4 (µg/ml)	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,32				
H	Klindamicin 4 (µg/ml)	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,32				

Slika 20: Shema mikrotitrne ploščice, kjer smo določili občutljivost *M. hominis* za antibiotike.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Levofloksacin 32 (µg/ml)	16	8	4	2	1	0,5	0,25	X	Kontrola ravnega gojišča	Kontrola antibiotika	Kontrola rasti v gojišču brez antibiotika
B	Levofloksacin 32 (µg/ml)	16	8	4	2	1	0,5	0,25				
C	Moksifloksacin 32 (µg/ml)	16	8	4	2	1	0,5	0,25				
D	Moksifloksacin 32 (µg/ml)	16	8	4	2	1	0,5	0,25				
E	Tetraciklin 16 (µg/ml)	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125				
F	Tetraciklin 16 (µg/ml)	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125				
G	Eritromicin 32 (µg/ml)	16	8	4	2	1	0,5	0,25				
H	Eritromicin 32 (µg/ml)	16	8	4	2	1	0,5	0,25				

Slika 21: Shema mikrotitrne ploščice, kjer smo določili občutljivost bakterij *Ureaplasma* spp. za antibiotike.

3.2.3 Shranjevanje bakterijskih kultur in gojišč

Po končanem testiranju smo kužnine bolnikov iz leta 2013 in 2014 shranili v zamrzovalniku pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vsa tekoča gojišča 10B in tekoča gojišča za mikoplazme, kjer so zrasle UM ter razredčine le teh za kvantifikacijo smo prelili v kriotubice in prav tako shranili pri temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Trdna gojišča A8 smo po preštetju kolonij shranili v anaerobnem loncu pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ še za 14 dni in opazovali, ali je prišlo do spremembe v številu kolonij. Nato smo plošče zavrgli.

4 REZULTATI

Za ugotavljanje občutljivosti UM za antibiotike smo testirali 111 kužnin bolnikov s PCR dokazano okužbo z *Ureaplasma* spp. ali z *M. hominis*, in sicer 89 brisov materničnega vratu (80 %) in 22 brisov sečnice moških (20 %). Od tega je imelo 105 kužnin bolnikov s PCR dokazano okužbo z bakterijami *Ureaplasma* spp. (94,6 %), le 6 pa z *M. hominis* (5,4 %). Občutljivost UM za eritromicin, klindamicin, levofloksacin, moksifloksacin in tetraciklin smo nato preverjali z dvema metodama, s kompletom reagentov Mycofast screening Revolution in z mikrodilucijsko metodo po standardu CLSI.

Vse urogenitalne kužnine bolnikov smo za določanje občutljivosti UM inokulirali v Mycofast Revolution ploščice, jih inkubirali in odčitali rast ter občutljivost UM za antibiotike. Če je bila koncentracija bakterij prevelika smo namesto bolnikove kužnine uporabili bakterije izolirane v tekočem gojišču 10B ali gojišču za mikoplazme, ki smo jih nato ustrezno redčili s transportnim gojiščem UMMt do koncentracije 10^3 ali 10^4 CFU/mL. Za dolčanje občutljivosti UM z metodo mikrodilucije po CLSI smo morali UM najprej izolirati v tekočem gojišču, in sicer ureaplazme v tekočem gojišču 10B, *M. hominis* pa v tekočem gojišču za mikoplazme. Tekoča gojišča z izoliranimi bakterijami smo nacepili na trdna gojišča A8, jih po inkubaciji prešteli in določili CFU/mL ter jih ustrezno redčili do koncentracije bakterij 10^3 oziroma 10^4 CFU/mL. Sledila je izvedba mikrodilucijskega testa, inkubacija ploščic in odčitavanje rasti ter občutljivosti UM za antibiotike. Po končanem testiranju smo vse izhodne kužnine in vzorce tekočih gojišč z izoliranimi bakterijami ustrezno shranili v zamrzovalniku pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rezultate obeh metod smo primerjali.

4.1 IZOLACIJA UROGENITALNIH MIKOPLAZEM V TEKOČIH GOJIŠČIH IN KVANTIFIKACIJA NA TRDNEM GOJIŠČU A8

4.1.1 Izolacija in kvantifikacija ureaplazem

Ureaplazme smo uspeli izolirati v tekočem gojišču 10B pri 101 vzorcih (96 %) od 105 kužnin urogenitalnih poti bolnikov s PCR dokazano okužbo z *Ureaplasma* spp. Iz štirih kužnin nismo uspeli izolirati omenjene bakterije v tekočem gojišču 10B. Za kvantifikacijo bakterij smo na trdno gojišče A8 inokulirali 101 izolat iz tekočega gojišča 10B in štiri izhodne kužnine pri katerih nismo dobili izolata ureaplazem v tekočem gojišču 10B. Pri 8 izolatih ureaplazem v tekočem gojišču 10B, ki smo jih inokulirali na trdno gojišče A8, ni prišlo do rasti ureaplazem, zato smo zanje prav tako inokulirali bolnikovo kužnino neposredno na trdno gojišče A8.

Z metodo PCR smo za 9 naključno izbranih vzorcev potrdili, da je do obarvanja tekočega 10B gojišča prišlo zaradi rasti ureaplazem in ne zaradi kontaminacije gojišča, saj je bila v vseh primerih v gojišču dokazana bakterija *U. urealyticum* (Preglednica 11).

Preglednica 11: Dokaz prisotnosti ureaplazem v tekočem gojišču 10B z metodo PCR.

Naključno izbrani vzorci	Metoda PCR
31/13	<i>U. urealyticum</i>
205/13	<i>U. urealyticum</i>
207/13	<i>U. urealyticum</i>
1417/13	<i>U. urealyticum</i>
1565/13	<i>U. urealyticum</i>
1367/14	<i>U. urealyticum</i>
1507/14	<i>U. urealyticum</i>
1647/14	<i>U. urealyticum</i>
1651/14	<i>U. urealyticum</i>

Na trdnem gojišču A8 so tako ureaplazme zrasle v kolonijah iz 54 tekočih gojišč 10B in 8 izhodnih kužnin (Preglednica 12). Skupno smo torej kvantificirali 62 izolatov (59 %), kjer so bakterije zrasle v čisti kulturi (Slika 22). Za 62 kvantificiranih izolatov smo z metodo štetja na plošči določili CFU/mL in kasneje izvedli mikrodilucijski test določanja občutljivosti za antibiotike po CLSI.

Slika 22: Rast bakterij *Ureaplasma* spp. na trdnem A8 gojišču (izgled kolonij).

Nekvantificiranih je ostalo 43 izolatov, saj 33 izolatov ureaplazem ni zraslo na trdnem gojišču A8, v 10 primerih so se razrasle glive, zato ti vzorci niso bili primerni za nadaljnje testiranje (Preglednica 12, podrobnejši rezultati Priloga A).

Preglednica 12: Prikaz rasti ureaplazem v tekočem gojišču 10B in na trdnem gojišču A8.

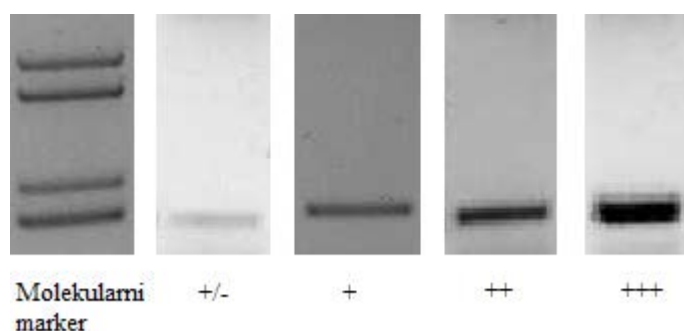
Število vzorcev (Skupaj 105)	Rast ureaplazem v tekočem gojišču 10B	Rast ureaplazem na trdnem gojišču A8
54	+	+
1	-	+
7	+	+
30	+	-
10	+	Glive
3	-	-

Legenda: Z **zeleno** so označeni vzorci kjer smo neposredno na trdno gojišče A8 nacepili izhodno kužnino bolnika.

Ker smo domnevali, da je malo ureaplazem v 33 kužninah pri katerih nismo potrdili njihove rasti na gojišču A8, smo preverili jakost produkta PCR, vendar naše domneve nismo potrdili. (Preglednica 13, Slika 23).

Preglednica 13: Prikaz rezultatov rasti bakterij *Ureaplasma* spp. v tekočem gojišču 10B in na trdnem gojišču A8, glede na jakost produkta PCR.

Jakost produkta PCR	Rast v tekočem gojišču 10B	Ni rasti v tekočem gojišču 10B	Rast na trdnem A8 gojišču- CFU/mL	Ni rasti na trdnem A8 gojišču- CFU/mL
+++	33	1	19	3 glive + 12 ni rasti
++	35	1	19	4 glive/drobir + 13 ni rasti
+	21	2	17	2 glive + 4 ni rasti
±	12	0	7	1 glive + 4 ni rasti
Skupaj	101	4	62	43



Slika 23: Umeritvena skala za ovrednotenje jakosti produktov PCR, +/- predstavlja najšibkejši produkt, +++ najmočnejši produkt.

4.1.2 Izolacija in kvantifikacija bakterije *Mycoplasma hominis*

Bakterijo *M. hominis* smo uspeli izolirati v tekočem gojišču za mikoplazme s polimiksinom in vorikonazolom (Slika 24) iz treh vzorcev (50 %) od 6ih kužnin bolnikov s PCR dokazano okužbo z *M. hominis*, iz treh kužnin pa omenjene bakterije nismo uspeli izolirati. Na trdno gojišče A8 smo nacepili vseh 6 kužnin. V petih primerih (83,3 % uspešnost) so mikoplazme zrastle v kolonijah (Slika 25) in smo jih lahko kvantificirali, z metodo štetja na plošči določili CFU/mL in kasneje izvedli mikrodilucijski test določanja občutljivosti za antibiotike po CLSI. Le eden izolat je ostal nekvantificiran (Preglednica 14).



Slika 24: Rast bakterije *M. hominis* v tekočem gojišču za mikoplazme, kjer je zaradi razgradnje arginina prišlo do spremembe pH gojišča in s tem spremembe barve; desno: negativna kontrola.



Slika 25: Rast bakterije *M. hominis* na trdnem A8 gojišču (izgled kolonij).

Preglednica 14: Jakost produkta PCR, rast v tekočem gojišču za mikoplazme in CFU/mL za vzorce pozitivne na bakterijo *M. hominis*.

MBL št. vzorca	Jakost produkta PCR	Rast v tekočem gojišču za mikoplazme	Rast na trdnem A8 gojišču- CFU/mL
5501/13	+	-	/
6431/13	++	-	$4,32 \cdot 10^6$
263/14	+	-	$4,56 \cdot 10^6$
1055/14	+	±	$3,38 \cdot 10^6$
1365/14	+++	+	$1,26 \cdot 10^5$
1789/14	+++	±	$5,8 \cdot 10^5$

Legenda: Vzorca označena z modro barvo, nista obarvala tekočega gojišča za mikoplazme, sta pa vseeno zrasla na trdnem gojišču A8, ±-sprememba barve gojišča ni bila tako intenzivna.

4.2 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI UROGENITALNIH MIKOPLAZEM S KOMPLETOM REAGENTOV

4.2.1 Določanje občutljivosti ureaplazem s kompletom reagentov

Občutljivost za eritromicin, klindamicin, levofloksacin, moksifloksacin in tetraciklin smo ugotavljali pri 105 urogenitalnih kužninah bolnikov, ki so imeli z metodo PCR dokazano okužbo z ureaplazmami. V ta namen smo uporabili komplet reagentov Mycofast Revolution. Uspešno smo izvedli 85 antibiogramov (81 % uspešnost) (Preglednica 15), saj so ureaplazme iz teh kužnin zrasle v koncentraciji $<10^5$ CCU/mL (Slika 26). Prav tako vsebina luknjic ni bila motna, torej ni prišlo do kontaminacije.

Pri 78 izolatih ureaplazem smo dokazali občutljivost bakterije za antibiotike, medtem ko smo odpornost ureaplazem proti antibiotikom ugotovili pri 7 sevih. Odpornost za levofloksacin in tetraciklin hkrati smo ugotovili pri enem izolatu, za levofloksacin pri štirih izolatih in za eritromicin pri dveh izolatih (Preglednica 15). Odpornosti ureaplazem za antibiotike nismo uspeli potrditi z metodo mikrodilucije, ker ureaplazme niso zrasle ali pa so zrasle v premajhnem številu na trdnem gojišču A8.

Preglednica 15: Ugotavljanje občutljivosti ureaplazem za določene antibiotike z metodo kompleta reagentov Mycofast Revolution.

Ugotavljanje občutljivosti ureaplazem za antibiotike s kompletom reagentov Mycofast Revolution	Število izolatov	Skupaj
Odporne proti LVX in TE	1	85
Odporne proti LVX	4	
Odporne proti E	2	
Občutljive za vse testirane antibiotike	78	
Neuspeli antibiogrami	(12 ni rasti, 8 rast gliv) 20	20
	Skupaj	105

Legenda: LVX-levofloksacin, TE-tetraciklin, E-eritromicin.



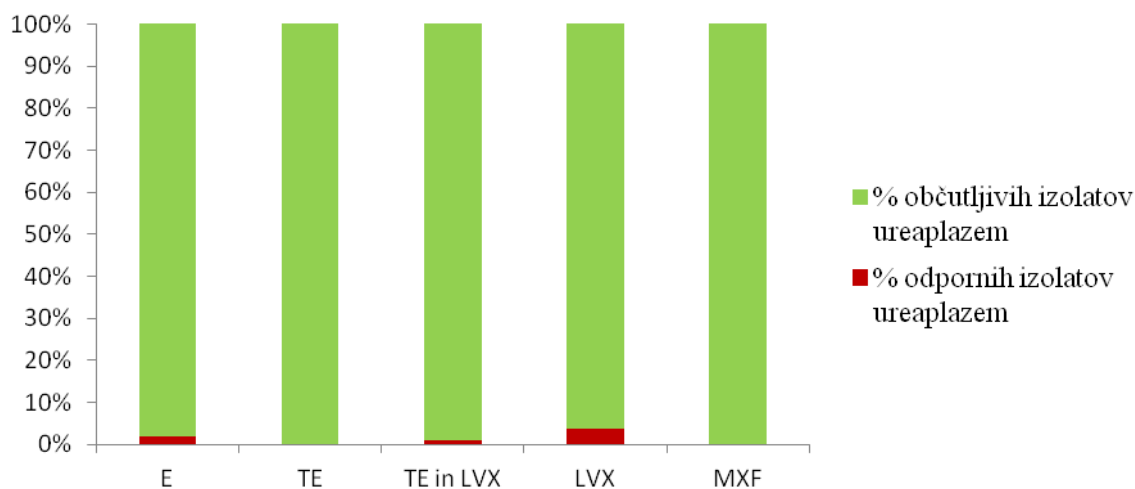
Slika 26: Primer rdeče/oranžnega obarvanja v primeru rasti bakterije *Ureaplasma* spp. pri metodi Mycofast Revolution, kjer je bakterija zrasla v previsoki koncentraciji ($>10^4$ CFU/mL).

S kompletom reagentov Mycofast Revolution smo ugotavljali občutljivost ureaplazem za antibiotike pri 105 izolatih in dokazali odpornost proti levofloksacinu pri 3,81 % testiranih vzorcev, proti eritromicinu pri 1,9 % testiranih vzorcev ter levofloksacinu in tetraciklinu hkrati pri 0,95 % testiranih vzorcev. Ureaplazme so bile občutljive za moksifloksacin (100 %) (Preglednica 16 in Slika 27).

Preglednica 16: Število in odstotek izolatov ureaplazem, ki so odporni ali občutljivi za določen antibiotik.

Antibiotik	Št. odpornih sevov ureaplazem	% odpornih sevov ureaplazem	% občutljivih sevov ureaplazem
E	2	1,9	98,1
TE	0	0	100
TE in LVX	1	0,95	99
LVX	4	3,81	96,2
MXF	0	0	100
Skupaj	7	6,67	95,2

Legenda: E-eritromicin, LVX-levofloksacin, TE-tetraciklin.



Slika 27: Odpornost ureaplazem izoliranih iz urogenitalnih poti bolnikov proti določenim antibiotikom ugotovljena z metodo kompleta reagentov Mycofast Revolution. Legenda: E-eritromicin, LVX-levofloksacin, TE-tetraciklin.

Občutljivost ureaplazem za antibiotike nismo mogli določiti pri 20 vzorcih zaradi kontaminacije z glivami v 8 primerih ali zaradi premajhne koncentracije ureaplazem v izhodni kužnini v 12 primerih (Preglednica 17).

Preglednica 17: Vzroki za neuspešnost antibiogramov pri določanju občutljivosti ureaplazem za antibiotike z metodo kompleta reagentov Mycofast Revolution.

Vzroki za neuspešnost antibiograma	Število neuspešnih antibiogramov	Skupaj
Rast gliv	8	8
Šibka jakost PCR	8	12
Ni bilo rasti ureaplazem v tekočem gojišču 10B in na trdnem gojišču A8	2	
Nepojasnjeno (močna jakost PCR)	2	
Skupaj		20

4.2.2 Določanje občutljivosti bakterije *Mycoplasma hominis* s kompletom reagentov

Pri 6 kužninah bolnikov s PCR dokazano okužbo z *M. hominis* smo uspešno izvedli pet antibiogramov (83,3 % uspešnost), kjer je prišlo do spremembe barve iz rumene v oranžno/rdečo (Slika 28) v vdolbinicah s koncentracijo bakterij $<10^4$ CCU/mL. Le pri enem primeru ni prišlo do rasti bakterije v vdolbinicah (Preglednica 18). Pri vseh petih primerih je bila *M. hominis* občutljiva za antibiotike in nismo dokazali odpornih sevov.



Slika 28: Primera rdeče/oranžnega obarvanja v primeru rasti bakterije *M. hominis* pri metodi Mycofast Revolution, kjer sta v obeh primerih zrasla seva občutljiva za vse testirane antibiotike, koncentracija bakterij pa je bila previsoka ($\geq 10^4$ CFU/mL).

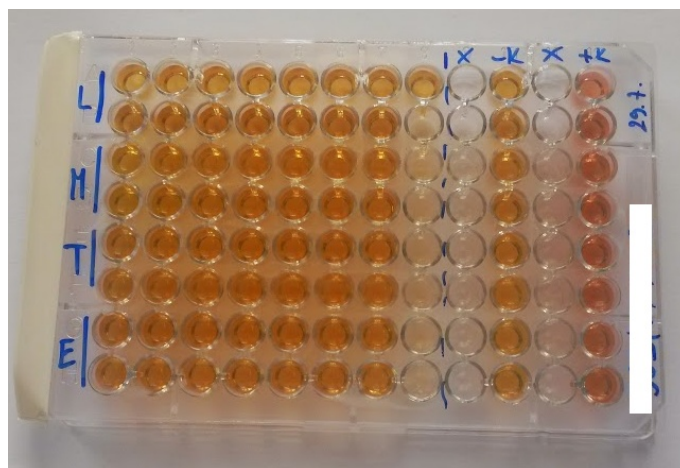
Preglednica 18: Ugotavljanje občutljivosti *M. hominis* za določene antibiotike z metodo kompleta reagentov Mycofast Revolution.

Ugotavljanje občutljivosti <i>M.hominis</i> za antibiotike s kompletom reagentov Mycofast Revolution	Število izolatov
Občutljiva za vse testirane antibiotike	5
Neuspeli antibiogram	1
Skupaj	6

4.3 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI UROGENITALNIH MIKOPLAZEM Z METODO MIKRODILUCIJE PO STANDARDU CLSI

4.3.1 Določanje občutljivosti ureaplazem z metodo mikrodilucije po standardu CLSI

Od 62 kvantificiranih vzorcev ureaplazem izoliranih v tekočem gojišču 10B ali iz primarnih kužnin bolnikov s PCR dokazano okužbo z *Ureaplasma* spp. smo uspešno izvedli mikrodilucijo v 45-ih primerih (73 % uspešnost). V vseh 45-ih primerih so ureaplazme v gojišču zrasle in s tem povzročile spremembo barve gojišča v vdolbinicah za kontrolo rasti, rezultati so se ujemali pri obeh ponovitvah za posamezen antibiotik, vsebina vdolbinic ni bila motna, pri kontroli gojišča in kontroli antibiotika ni bilo rasti bakterij, prav tako ni bilo rasti bakterij v vdolbinicah z najvišjo koncentracijo posameznega antibiotika (Slika 29).



Slika 29: Primer rdeče/oranžnega obarvanja v primeru rasti za vse antibiotike občutljivega seva *Ureaplasma* spp. pri metodi mikrodilucije po standardu CLSI (+K oziroma pozitivna kontrola se je obarvala, medtem, ko pri različnih koncentracijah antibiotikov ni prišlo do obarvanja oziroma rasti organizma).

V 17-ih primerih izvedba mikrodilucije ni bila možna, saj so imeli vzorci pri štirih primerih uspešen antibiogram, vendar prenizek CFU/mL za izvedbo mikrodilucije. V 10-ih primerih sta bila antibiogram in mikrodilucija neuspešna zaradi prenizkega CFU/mL ali prisotnosti gliv. Pri treh primerih smo z metodo kompleta reagentov Mycofast Revolution ugotovili odpornost ureaplazem proti levofloksacinu, vendar zanje nismo mogli izvesti mikrodilucijskega testa po CLSI zaradi prenizkega CFU/mL ali pomanjkanja kužnine (Preglednica 19).

4.3.2 Določanje občutljivosti bakterije *Mycoplasma hominis* z metodo mikrodilucije po standardu CLSI

Za pet kvantificiranih vzorcev z uspešno izolirano *M. hominis* v tekočem gojišču za mikoplazme smo prav tako izvedli mikrodilucijo, ki je bila uspešna v štirih primerih (80 % uspešnost) v enem primeru pa neuspešna. Skupno je bilo 6 izhodnih kužnin s PCR dokazano okužbo z *M. hominis*, vendar v enem primeru nismo uspeli izolirati organizma v tekočem gojišču za mikoplazme in ne na trdnem gojišču A8, zato mikrodilucija za ta vzorec ni bila možna.

4.3.3 Primerjava rezultatov občutljivosti pridobljenih s kompletom reagentov Mycofast Revolution z rezultati mikrodilucijske metode po CLSI

Pri primerjavi obeh metod za določanje občutljivosti ureaplazem za antibiotike smo ugotovili, da se rezultati obeh metod ujemajo v 41 primerih, saj smo z obema metodama dokazali občutljivost ureaplazem za vse testirane antibiotike. Pri štirih vzorcih, ki so imeli neuspešen test s kompletom reagentov, vendar uspešno mikrodilucijo, je kljub ponovitvi prišlo do nepojasnjene odstopanja rezultatov (Preglednica 19).

Preglednica 19: Primerjava rezultatov metode kompleta reagentov Mycofast Revolution in mikrodilucije povzete po standardu CLSI za določanje občutljivosti ureaplazem za posamezne antibiotike.

Določanje občutljivosti ureaplazem za antibiotike s kompletom reagentov Mycofast Revolution	Določanje občutljivosti ureaplazem za antibiotike z metodo mikrodilucije po standardu CLSI	Število
Občutljiv	Občutljiv	41
Neuspešen	Občutljiv	4
Občutljiv	Neuspešen (prenizek CFU/mL)	4
Neuspešen	Neuspešen	10
Odporen proti LVX	-	4
Odporen proti LVX in TE	-	1
Odporen proti E	-	2
Skupaj		66

Legenda: LVX-levofloksacin, TE-tetraciklin, E-eritromicin.

Rezultati občutljivosti *M. hominis* za posamezne antibiotike pridobljeni z metodo kompleta reagentov Mycofast Revolution, so se popolnoma ujemali z rezultati mikrodilucije po standardu CLSI, saj smo v štirih primerih z obema metodama dokazali občutljivost bakterije, v enem primeru pa sta bili obe metodi neuspešni (Preglednica 20).

Preglednica 20: Primerjava rezultatov metode kompleta reagentov Mycofast Revolution in mikrodilucije po standardu CLSI za določanje občutljivosti *M. hominis* za posamezne antibiotike.

Določanje občutljivosti <i>M. hominis</i> za antibiotike s kompletom reagentov Mycofast Revolution	Določanje občutljivosti <i>M. hominis</i> za antibiotike z metodo mikrodilucije po standardu CLSI	Število
Občutljiv	Občutljiv	4
Neuspešen	Neuspešen	1
Skupaj	5	

5 RAZPRAVA

Urogenitalne mikoplazme, kamor sodijo *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* in *Ureaplasma* spp. (Redelinghuys in sod., 2013a) uvrščamo med eubakterije, in sicer v razred *Mollicutes* (Holt in sod., 1994). So najmanjše znane prostoživeče, samopodvajajoče bakterije, ki so brez celične stene in so zato odporne proti beta laktamom in glikopeptidom ter jih ne moremo barvati po Gramu (Beeton in sod., 2009a). Lahko živijo kot paraziti ali saprofiti (Waites in sod., 2012a), pogosto pa jih najdemo tudi kot komenzale v genitourinarnem traktu spolno aktivnih ljudi (Redelinghuys in sod., 2013a).

Okužbe z njimi lahko povzročajo različne vnetne procese urogenitalnega trakta pri odraslih osebah in respiratornega trakta pri novorojencih (Weits in sod., 2012a), vendar sama patogeneza UM še ni popolnoma pojasnjena (Ponyai in sod., 2013). Za ureaplazme predvidevajo, da povzročajo vnetje sečnice pri moških, pri ženskah pa cistitis, spontani splav, prezgodnji porod in neplodnost (Song in sod., 2014). *Mycoplasma hominis* naj bi povzročala uretritis, salpingitis, bakterijsko vaginozo, neplodnost ter okužbe respiratornega trakta in živčevja pri novorojencih (Diaz in sod., 2013). Okužbe z UM so pogostejše pri nosečnicah, kar 40-80 % zdravih, asimptomatskih žensk pa ima sluznico materničnega vratu ali nožnice kolonizirano z ureaplazmami, več kot 50 % pa z bakterijo *M. hominis*. Okužbe spodnjega genitalnega trakta zdravih asimptomatskih moških z ureaplazmami so redkejšje (Song in sod., 2013).

Standardna metoda za dokaz okužbe z bakterijo *M. hominis* in *Ureaplasma* spp. še vedno ostaja gojenje, kjer potrebujemo specifična kompleksna gojišča in usposobljeno osebje. Zaradi njihove občutljivosti za okoljske vplive je predvsem potrebna posebna pozornost pri odvzemu vzorca, nacepljanju vzorca v transportno gojišče ter prenosu do laboratorija. Rezultati so navadno znani v 2-5 dneh. Bakteriji se ločita po izgledu kolonij na trdnem gojišču A8, kjer *Ureaplasma* spp. tvori zrnate kolonije podobne »morskemu ježku«, *M. hominis* pa kolonije v obliki »pečenega jajca«. Zaradi manjše občutljivosti metode in zahtevnosti izvedbe, se je predvsem v zadnjih letih začela uveljavljati metoda PCR, ki jo pogosto uporabljamo tudi za ločevanje med vrstama *U. urealyticum* in *U. parvum*. Prednost te metode pred gojenjem je tudi v tem, da niso potrebni živi organizmi za dokazovanje okužbe, rezultati pa so na voljo že v enem dnevu (Waites in sod., 2012a).

Za zdravljenje okužb z ureaplazmo se najpogosteje uporabljata doksiciklin in azitromicin oziroma klindamicin za zdravljenje okužb z bakterijo *M. hominis* (Ponyai in sod., 2013). Poleg naštetih antibiotikov, se uporabljajo tudi ostali tetraciklini in fluorokinoloni, kot so ofloksacin, ciprofloksacin, levofloksacin, gemifloksacin in moksifloksacin (Redelinghuys in sod., 2013). Zaradi nenehne uporabe širokospektralnih antibiotikov je prišlo do zvišanja stopnje odpornosti ureaplazem in mikoplazem (Ye in sod., 2014), zato se vedno bolj kaže potreba po ugotavljanju občutljivosti UM za antibiotike. Za preprečitev zapletov pri

nosečnicah in novorojencih pa se priporoča tudi uvedba presejalnih testov (Radelynghus in sod., 2014).

Namen našega magistrskega dela je bilo ugotoviti ali je na območju Slovenije že prišlo do pojava sevov UM odpornih proti antibiotikom, ki se uporabljajo za zdravljenje. V raziskavo smo vključili urogenitalne kužnine moških in žensk odvzetih v Univerzitetnem Kliničnem Centru Ljubljana, na Infekcijski kliniki v letih 2013 in 2014. V Laboratoriju za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske Fakultete so v vzorcih dokazali navzočnost DNA *M. hominis*, *U. parvum* ali *U. urealyticum*. Občutljivost UM za eritromicin, klindamicin, levofloksacin, moksifloksacin in tetraciklin smo preverjali s kompletom reagentov Mycofast screening RevolutioN (ELITech, Francija) in z mikrodilucijsko metodo po standardu CLSI. Rezultate obeh metod smo primerjali.

Za ugotavljanje odpornosti UM proti posameznim antibiotikom smo najprej morali bakterije gojiti v primernem tekočem gojišču, in sicer ureaplazme v tekočem gojišču 10B in mikoplazme v tekočem gojišču za mikoplazme. Večina ureaplazem je v tekočem gojišču zrastle (96 %), zato je gojišče spremenilo barvo iz rumene v oranžno/rdečo, čeprav naj bi se po standardu CLSI obarvalo rožnato. Ob rasti mikoplazem naj bi gojišče spremenilo barvo iz rožnate v bolj temno rdečo, v našem primeru se je prav tako obarvalo iz rumene v oranžno/rdečo v 50 %. Seveda je tu potrebno poudariti, da je odčitavanje barve zelo subjektivno in je verjetno zaradi tega prišlo do odstopanja od samega standarda. Prav tako so že Waites in njegovi sodelavci leta 2012 opisali težave pri določanju spremembe barve tekočega gojišča 10B, zato so raje uporabili komercialno pripravljeno gojišče (Waites in sod., 2012b).

Devet naključno izbranih vzorcev pri katerih so bakterije zrastle v tekočem gojišču 10B, smo preverili tudi z metodo PCR in tako zagotovili, da je prišlo do obarvanja gojišča dejansko zaradi rasti bakterij *Ureaplasma* spp. in ne zaradi kontaminacije gojišča. V tekoče gojišče za mikoplazme smo morali zaradi pogostega razrasta gliv dodati še dodatna dva antimikotika, in sicer polimiksin in vorikonazol.

Največ težav se je pojavilo pri rasti ureaplazem in *M. hominis* na trdnem gojišču A8 za kvantifikacijo. Ker pri določenih vzorcih s pozitivnim gojiščem 10B ali gojiščem za mikoplazme po nacepiti 20 µL na trdno gojišče A8 ni prišlo do rasti, smo poizkusili povečati inokulum za nacepljanje vzorca v tekoče gojišče 10B iz 100 µL na 200 µL v epruvetki na navoj in inokulum za nacepljanje na trdno gojišče A8 iz 20 µL na 50 µL in 100 µL, ali pa smo direktno na trdno gojišče A8 nacepili kužnino bolnika. S tem smo povečali sam inokulum in zmanjšali izmenjavo plinov med fazo zraka in tekočine v manjši epruvetki. Preverili smo tudi jakost produktov PCR, ki se je med nekvantificiranimi vzorci razlikovala od šibke do zelo močne reakcije PCR. Ker kljub poizkušanju izboljšanja rasti do le te ni prišlo, smo sklepali, da so bakterije najverjetneje med postopki odtajanja in

ponovnega zamrzovanja vzorcev propadle. Deset vzorcev z izoliranimi ureaplazmami v tekočem gojišču 10B, je bilo kontaminiranih z glivami, ki so prerasle trdno gojišče A8.

Pri ugotavljanju občutljivosti UM za antibiotike s kompletom reagentov Mycofast Revolution smo 20 neuspešnih antibiogramov ponovili in za vsako od izhodnih kužnin preverili jakost produktov PCR. Ugotovili smo, da je 8 vzorcev bilo kontaminiranih z glivami, ki so preprečile rast ureaplazem. Pri 8-ih antibiogramih ureaplazme niso zrasle, ker je bilo v kužnini bolnikov navzočih premalo bakterij, da bi jih lahko izolirali. Ureaplazme iz dveh kužnin bolnikov prav tako niso zrasle v tekočem gojišču 10B in ne na trdnem gojišču A8, ker so verjetno propadle med odtaljevanjem in zamrzovanjem. V dveh primerih pa sta antibiograma kljub ponovitvi ostala negativna, čeprav je bil produkt reakcije PCR močen.

Pri določanju občutljivosti *M. hominis* za antibiotike s kompletom reagentov Mycofast Revolution ni uspel le en antibiogram, ker je bilo v kužnini prisotnih premalo bakterij, na kar kaže šibka moč produkta reakcije PCR.

Občutljivost UM za antibiotike smo prav tako preverjali z metodo mikrodilucije po standardu CLSI, s katero nismo določili odpornih sevov. Pri 17-ih kužninah s PCR dokazano okužbo z ureaplazmo pa nam izvedba mikrodilucije ni uspela zaradi prenizke koncentracije ureaplazem v 13-ih vzorcih, zaradi prisotnosti gliv v štirih primerih in v enem primeru bakterije niso zrasle v tekočem gojišču 10B. Za pet kvantificiranih vzorcev bolnikov pozitivnih le na *M. hominis* smo prav tako izvedli mikrodilucijsko metodo, ki je bila uspešna v štirih primerih (80 %), v enem pa neuspešna, ker so bakterije verjetno propadle med odtaljevanjem in zamrzovanjem.

S kompletom reagentov Mycofast Revolution smo od 105 testiranih vzorcev pri 78 vzorcih ureaplazem dokazali občutljivost bakterije za antibiotike, medtem ko smo pri 7-ih (6,67 %) izolatih *Ureaplasma* spp. odkrili odpornost proti enemu ali dveh antibiotikih hkrati; štirje izolati ureaplazem so bili odporni proti levofloksacinu (3,81 %), dva proti eritromicinu (1,9 %) in eden proti levofloksacinu ter tetraciklinu hkrati (0,95 %). Ureaplazme so bile občutljive za moksifloksacin (100 %). S kompletom reagentov Mycofast Revolution smo ugotovili občutljivost *M. hominis* za vse antibiotike.

Odpornosti ureaplazem za antibiotike nismo uspeli potrditi z metodo mikrodilucije, ker ureaplazme niso zrasle, ali pa so zrasle v premajhnem številu na trdnem gojišču A8. Pri ostalih izolatih ureaplazem in bakterij *M. hominis* nismo dokazali odpornosti proti antibiotikom.

V magistrski nalogi smo iz bolnikovih kužnin izolirali za antibiotike odporne le posamezne seve bakterij *Ureaplasma* spp., ne pa tudi odpornih sevov *M. hominis*, kar je v skladu z ugotovitvami madžarske študije, kjer so prav tako testirali majhno število izolatov *M. hominis* (Ponyai in sod., 2013). Tudi v naši študiji smo imeli premalo izolatov *M. hominis*,

da bi lahko odkrili odporne seve omenjene bakterije proti določenim antibiotikom. Nasprotno pa so v raziskavah na Kitajskem, v Turčiji ter v Franciji med leti 1999 in 2000 dokazali seve *M. hominis* odporne proti različnim antibiotikom, verjetno zaradi testiranja večjega števila izolatov (Song in sod., 2014; Bayraktar in sod., 2010; Pereyre in Pharm, 2014).

Ugotovili smo, da so se v Sloveniji že pojavili sevi ureaplazem odporni proti levofloksacinu (3,81 %), ki sodi med kinolone oziroma fluorokinolone. Tudi Song in sodelavcev so leta 2014 na Kitajskem dokazali enako, vendar pa je bila dokazana odpornost ureaplazem proti kinolonom na Kitajskem mnogo višja (>50 %). V Južni Afriki so Redelinghuys in sodelavci leta 2014 poročali o naraščanju pojavljanja odpornosti ureaplazem proti levofloksacinu (40 %). V Italiji pa so leta 2013 DeFrancesco in sodelavci dokazali visoko stopnjo odpornosti ureaplazem proti fluorokinolonu ciprofloksacinu (60 %) in ne levofloksacinu. Predvidevamo, da do takšnih razlik v odpornosti ureaplazem proti fluorokinolonskim antibiotikom prihaja zaradi različne rabe antibiotikov v posameznih državah. V nasprotju z omenjenimi študijami in v skladu z našimi rezultati o dokaj nizki odpornosti, so v Franciji leta 2000 dokazali odpornost ureaplazem proti levofloksacinu v zelo nizkem deležu (manj kot 1 %), vendar tudi tu poročajo o naraščanju števila odpornih sevov UM proti kinolonom, zaradi vse pogostejše uporabe kinolonskih antibiotikov za zdravljenje urogenitalnih okužb (Redelinghuys in sod., 2014; De Francesco in sod., 2013; Bayraktar in sod., 2010; Pereyre in Pharm, 2014).

V študiji smo dokazali tudi odpornost ureaplazem proti eritromicinu (1,9 %), ki je prav tako nižja od ugotovljene odpornosti pri študijah Ponyai in sodelavcev leta 2013 na Madžarskem, Redelinghuys in sodelavcev leta 2014 v Južni Afriki ter Bayraktar in sodelavcev leta 2010 v Turčiji, kjer se giblje okoli 80 %. V Turčiji so celo poročali o 100 % odpornosti *M. hominis* proti eritromicinu, kar vsekakor ni v skladu z našimi ugotovitvami, so pa v tem primeru testiranje izvajali z drugačnim kompletom reagentov (IST-2) kot v naši magistrski nalogi. Razlike med našimi rezultati in rezultati drugih držav se pojavljajo zaradi različnih testiranih populacij (nosečnice, pacienti z negonokoknim uretritisom), različnega števila testiranih oseb, različnega časovnega obdobja testiranja, uporabe različnih kompletov reagentov (Mycofast Revolution, IST-2, Urea Myco Duo) kot tudi zaradi različne geografske lege. V Kitajski so primeri proti eritromicinu odpornih UM pogosti zaradi pretirane uporabe makrolidnih antibiotikov. V Italiji so v študiji ugotovili odpornost ureaplazem proti eritromicinu v nizkem deležu (15 %), tako kot v naši študiji (Ponyai in sod., 2013; Redelinghuys in sod., 2014; De Francesco in sod., 2013; Bayraktar in sod., 2010).

Sočasne odpornosti ureaplazem proti levofloksacinu in tetraciklinu, ki smo jo pri nas ugotovili v enem primeru, nismo zasledili v ostalih študijah, se pa odpornost proti tetraciklinu v različnih študijah giblje od 5 % do 90 %, odvisno od testirane populacije. Za razliko od naših ugotovitev, so se med leti 1999 in 2000 v Franciji poleg sevov ureaplazem

odpornih proti tetraciklinu (2 %) v večjem številu pojavljali tudi sevi *M. hominis* odporni proti omenjenemu antibiotiku (19 %). Podobno so odkrili tudi v nekaterih drugih državah, kot so Velika Britanija, Kitajska in Madžarska, kjer je bila stopnja odpornosti *M. hominis* (10 %), višja od stopnje odpornosti ureaplazem (manj kot 5 %) proti tetraciklinu. Naši rezultati se v tem primeru bolj ujemajo z rezultati raziskave Bayraktar in sodelavcev leta 2010 v Turčiji, kjer so bile UM 100 % občutljive za tetracikline. Znano je, da je odpornost UM proti tetraciklinom odvisna od geografske lege in različne uporabe antibiotikov v posameznih državah in se giblje od 10 % do 40 % (Pereyre in Pharm, 2014; Ponyai in sod., 2013; Bayraktar in sod., 2010).

Iz pridobljenih rezultatov je razvidno, da je v Sloveniji odpornost UM dokaj redek pojav, saj se je pri vseh testiranih kužninah bolnikov pojavilo 6,67% odpornih sevov. Danes še ni bojazni, da bi med različnimi sevi prihajalo do horizontalnih prenosov genov za odpornost. Do različnih rezultatov študij glede odpornosti proti antibiotikom lahko prihaja zaradi različne rabe antibiotikov za zdravljenje v različnih državah oziroma območjih, prav tako pa lahko na rezultat vplivajo proučevana populacija in uporabljeni kompleti reagentov (Redelinghuys in sod., 2014). Za zdravljenje okužb se tako še vedno najbolj pogosto uporabljajo makrolidni in tetraciklinski antibiotiki (Beeton in sod., 2009).

6 SKLEPI

- Za ugotavljanje občutljivosti UM za antibiotike smo izbrali kužnine 105 bolnikov, ki so imeli z metodo PCR dokazano okužbo z bakterijo *Ureaplasma* spp. (94,6 %) in kužnine 6 bolnikov okuženih z bakterijo *M. hominis* (5,4 %).
- Občutljivost UM za antibiotike smo ugotavljali z dvema metodama. Najprej smo test izvedli s kompletom reagentov Mycofast Revolution, katere uspešnost je bila dokaj visoka za oba mikroorganizma, in sicer za *Ureaplasma* spp. 81 % ter za *M. hominis* 83,3 %.
- S kompletom reagentov Mycofast Revolution smo ugotovili 7 (6,67 %) odpornih sevov ureaplazem proti določenim antibiotikom, in sicer pri štirih izolatih proti levofloksacinu (3,81 %), pri dveh izolatih proti eritromicinu (1,9 %) in pri enem izolatu proti levofloksacinu ter tetraciklinu hkrati (0,95 %).
- V naši raziskavi nismo dokazali odpornih sevov *M. hominis* za antibiotike, vendar smo imeli premajhno število izolatov.
- Druga uporabljena metoda za določanja občutljivosti UM za posamezne antibiotike je bila mikrodilucija po standardu CLSI, ki smo jo izvedli izključno za kvantificirane vzorce. Pri vzorcih s PCR dokazano okužbo z ureaplazmo je bila ta metoda uspešna v 73 %, pri vzorcih s PCR dokazano okužbo z *M. hominis* pa v 80 %.
- Z metodo mikrodilucije po standardu CLSI žal nismo bili uspešni pri potrjevanju odpornih sevov *Ureaplasma* spp. za antibiotike, ker bakterije niso zrasle ali pa so zrasle v prenizki koncentraciji na trdnem gojišču A8.
- Gojenje ureaplazem v tekočem gojišču 10B se je izkazalo kot uspešna metoda (96 % uspešnost), pri gojenju *M. hominis* v tekočem gojišču za mikoplazme je bila uspešnost manjša (50 %).
- Kvantifikacija bakterij na trdnem gojišču A8 je predstavljala največji problem. Pri ureaplazmah je bila uspešnost 59 %, pri *M. hominis* pa je bila uspešnost višja (83,3 %). Sklepamo, da bakterije niso zrasle, ker so propadle zaradi večkratnega odmrzovanja in zamrzovanja vzorcev.
- Odpornost UM proti antibiotikom smo lahko dokazali le z kompletom reagentov Mycofast Revolution.

- Izvedba testa s kompletom reagentov Mycofast Revolution je hitra in enostavnejša od klasične mikrodilucijske metode po CLSI.

7 POVZETEK

Urogenitalne mikoplazme so ubikvitarni mikroorganizmi, ki jih uvrščamo med eubakterije. Za človeka so najpomembnejše *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* in *Ureaplasma spp.*, kamor se uvrščata *U. urealyticum* in *U. parvum*. Veljajo za najmanjše znane prostoživeče in samopodvajajoče mikroorganizme. Nimajo celične stene, zato so odporne proti antibiotikom, ki delujejo na celično steno in jih ne moremo barvati po Gramu. Njihova patogeneza še ni popolnoma pojasnjena, vendar domnevajo, da naj bi povzročale urogenitalne okužbe in zaplete pri nosečnicah. Ker pa so UM odkrili tudi pri zdravih osebah, je težko pojasniti njihovo patogenetsko vlogo. Najdemo jih v urogenitalnem traktu spolno aktivnih oseb, in sicer najpogosteje pri ženskah. Zlati standard za ugotavljanje okužb z UM je osamitev organizmov iz brisa sečnice ali materničnega vratu na trdnem gojišču, kjer ureaplazme tvorijo zrnate kolonije v obliki »morskega ježka«, mikoplazme pa kolonije podobne obliki »pečenega jajca«. Vse bolj se uveljavlja tudi metoda PCR. Za zdravljenje okužb se uporabljajo predvsem makrolidi in tetraciklini, vendar je že prišlo do pojava sevov odpornih proti njim.

V naši magistrski nalogi smo želeli ugotoviti ali je na območju Slovenije že prišlo do pojava sevov UM odpornih proti antibiotikom, ki se uporabljajo za zdravljenje okužb. V raziskavo smo vključili urogenitalne kužnine moških in žensk odvzetih v Univerzitetnem Kliničnem Centru Ljubljana, na Infekcijski kliniki v letih 2013 in 2014. V vzorcih so v Laboratoriju za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami inštituta za Mikrobiologijo in imunologijo Medicinske Fakultete dokazali navzočnost DNA *M. hominis*, *U. parvum* ali *U. urealyticum*. Občutljivost UM za eritromicin, klindamicin, levofloksacin, moksifloksacin in tetraciklin smo preverjali s komercialnim testom Mycofast screening RevolutionN (ELITech, Francija) in z mikrodilucijsko metodo po standardu CLSI. Primerjali smo rezultate obeh metod.

Z metodo PCR je bila v kužninah 105 bolnikov dokazana *Ureaplasma spp.* in pri 6 *M. hominis*. V tekočem gojišču 10B ali gojišču za mikoplazme smo v 96 % uspešno izolirali ureaplazme in v 50 % *M. hominis*. Težavneje je bilo gojenje organizmov na trdnem gojišču A8 za kvantifikacijo, kjer je bila uspešnost gojenja ureaplazem 59 %, gojenja *M. hominis* pa 83,3 %.

Pri ureaplazmah smo ugotovili odporne seve proti določenim antibiotikom, in sicer pri štirih izolatih proti levofloksacinu (3,81 %), pri dveh izolatih proti eritromicinu (1,9 % odpornost) in pri enem izolatu proti levofloksacinu ter tetraciklinu hkrati (0,95 % odpornost). Odpornost smo lahko določili le z metodo kompleta reagentov Mycofast Revolution, saj izvedba mikrodilucije po standardu CLSI za te vzorce žal ni bila uspešna.

8 VIRI

- Bayraktar M. R., Ozerol I. H., Gucluer N., Celik O. 2010. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant woman. International Journal of Infectious Diseases, 14: e90-e95
- Bebear C. M., Kempf I. 2005. Antimicrobial therapy and antimicrobial resistance. V: *Mycoplasma: Molecular biology pathology and strategies for control*. Blanchard A., Browning G. (eds.). Norfolk, Horizon Bioscience: 535-568
- Bebear C., Pereyre S., Bebear C. M. 2006. *Mycoplasma* spp. V: Principles and practice of clinical bacteriology. 2nd ed. Gillespie S. H., Hawkey P. M. (eds.). West Sussex, John Wiley and Sons Ltd: 305-317
- Beeton M. L., Chalker V. J., Maxwell N. C., Kotecha S., Spiller B. 2009a. Concurrent titration and determination of antibiotic resistance in *Ureaplasma* species with identification of novel point mutations in genes associated with resistance. Antimicrobial Agents and Chemoterapy, 53, 5: 2020-2027
- Beeton M. L., Chalker V. J., Kotecha S., Spiller B. O. 2009b. Comparison of full *gyrA*, *gyrB*, *gyrC* and *parE* gene sequences between all *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* serovars to separate true fluoroquinolone antibiotic resistance mutations from non resistance polymorphism. Journal of Antimicrobial Chemoterapy, 64: 529-538
- Brown R. D., May M., Bradbury M. J., Johansson K. E., Neimark H. 2010. Phylum XVI. *Tenericutes*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 4. 2nd ed. Krieg N. R., Ludwig W., Whitman W., Hedlund B. P., Paster B. J., Staley J. T., Ward N., Brown D., Parte A. (eds.). New York, Springer: 567-722
- CLSI. 2011. Methods for antimicrobial susceptibility testing of human mycoplasmas. Approved Guideline M43-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 52 str.
- De Francesco M. A., Caracciolo S., Bonfanti C., Manca N. 2013. Incidence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* isolated in Brescia, over 7 years. Journal of Infection and Chemoterapy, 19: 621-627
- Dhawan B., Kokkayil P. 2015. *Ureaplasma*: Current perspectives. Indian Journal of Medical Microbiology, 33, 2: 205-214

- Diaz L., Cabrera L. E., Fernandez T., Ibanez I., Torres Y., Obregon Y., Rivero Y. 2013. Frequency and antimicrobial sensitivity of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in patients with vaginal discharge. MEDICC Review, 15, 4: 45-47
- ELITechGroup solutions. 2015a. Mycrobology reagents: A7 agar. Simple protocol. Paris, ELITechGroup solutions: 2 str.
<http://www.elitechgroup.com/corporate/products/market-segment/microbiology/bacteriology/mycoplasma/current-range/a7-agar-ref66/features> (2. februar 2016)
- ELITechGroup solutions. 2015b. Mycrobology reagents: Mycofast RevolutionN screening method. Urogenital plasma diagnosis: Detection, enumeration, identification and antimicrobial susceptibility testing. Paris, ELITechGroup solutions: 2 str.
http://www.elitechgroup.com/_upload/ressources/corporate/products/microbiology/mycoplasma/screen_english_33.pdf (17. november 2014)
- EMBL-EBI. 2015. Ensembl Bacteria: *Mycoplasma hominis* ATCC 23114. Cambridge, European Bioinformatics Institute: 1 str.
http://bacteria.ensembl.org/mycoplasma_hominis_atcc_23114/Location/View?r=Chromosome:330722-334722 (2. februar 2016)
- Ferandon C., Peuchant O., Renaudin H., Bebear C. 2013. Diversity of *Mycoplasma hominis* clinical isolates from Bordeaux, France, as assessed by multiplelocus variable-number tandem repeat analysis. BMC Microbiology, 13: 120, doi: 10.1186/1471-2180-13-120: 9 str.
- Glass J. I., Lefkowitz E. J., Glass J. S., Heiner C. R., Chen E. Y., Cassell G. H. 2000. The complete sequence of mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. Nature, 407: 757-762
- Govender S., Chalkley L. 2012. Tetracycline resistance genes of ureaplasmas. Southern African Journal of Epidemiology and Infections, 27, 1: 19-23
- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore, Williams and Wilkins: 705-717
- Hopfe D., Dahlmanns T., Henrich B. 2011. In *Mycoplasma hominis* the OppA-mediated cytoadhesion depends on its ATPase activity. BMC Microbiology, 11: 185, doi: 10.1186/1471-2180-11-185: 9 str.

- Hopfe M., Deenen R., Degrandi D., Köhrer K., Henrich B. 2013. Host cell responses to persist mycoplasmas-different stages in infection of HeLa cells with *Mycoplasma hominis*. Plos One, 8, 1: e54219, doi: 10.1371/journal.pone.0054219: 17 str.
- Ihan A., Avšič-Županc T. 2002. Mikoplazme. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinsk razgledi: 329-332
- Jones J. A., Chaban N., May M. 2013. Global rates and prevalence of urogenital mycoplasmosis: assembly of dataset from peer-reviewed literature. Open Journal of Medical Microbiology, 3: 2, doi: 10.4236/ojmm.2013.32017: 20 str.
- Keše D., Lorenčič Robnik S., Gorišek-Mikšić N., Kogoj R., Košir G. 2014. Urogenitalne mikoplazme pregledno in prikaz primera izvengitalne okužbe z bakterijo *Mycoplasma hominis*. Medicinski razgledi, 53, 6:83-92
- Kohanski M.A., Dawyer D. J., Collins J. J. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. Nature Reviews Microbiology, 8: 423-435
- Kotnik V. 2002. Antibiotiki in kemoterapevtiki. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinsk razgledi: 427-438
- Lancini G., Parenti F., Gallo G. G. 1995. Antibiotics: a multidisciplinary approach. New York, Plenum Press: 279 str.
- Ljubin-Sternak S., Meštrović T. 2014. *Chlamydia trachomatis* and genital mycoplasmas: Pathogens with an impact on human reproductive health. Journal of Pathogens, 2014: ID 183167, doi: 10.1155/2014/183167: 15 str.
- Ludwig W., Euzéby J., Whitman B. W. 2010. Road map of the phyla *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (Mollicutes), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* and *Planctomycetes*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 4. 2nd ed. Krieg N. R., Ludwig W., Whitman W., Hedlund B. P., Paster B. J., Staley J. T., Ward N., Brown D., Parte A. (eds.). New York, Springer: 1-19
- Madigan M. T., Martinko J. M., Dunlap P. V., Clark D. P. 2009. Brock biology of microorganisms. 12th ed. San Francisco, Pearson Education: 1060 str.
- Mares M., Nastasa V., Doroftei B., Chifiriuc M. C., Bleotu C., Socolov D. 2011. Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* isolated

during a population-based study concerning women infertility in northeast Romania. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 256-260

Marovt M., Keše D., Kotar T., Kmet N., Matičič M. 2014. Kliničen pomen ureaplazem pri osebah z okužbo spodnjega urogenitalnega trakta: rezultati slovenske raziskave. *Medicinski razgledi*, 53, 6: 93-98

Medical microbiology and infection: Chlamydia, Mycoplasma, Rickettsia (Bacteriology). 2015. Crankshaft Publishing, what-when-how: 1 str.

<http://what-when-how.com/medical-microbiology-and-infection/chlamydia-mycoplasma-and-rickettsia-bacteriology-medical-microbiology-and-infection/> (21. maj 2015)

NIPA. 2004. Antibiotic drugs: Levofloxacin. Canada, National Information Program of Antibiotics: 5 str.

<http://www.antibiotics-info.org/levofloxacin-tavanic.html> (1. september 2015)

Paralanov V., Lu J., Duffy L.B., Crabb D. M., Shrivastava S., Methe B.A., Iman J., Yooseph S., Xiao L., Cassell G. H., Waites K. B., Glass J. I. 2012. Comparative genome analysis of 19 *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* strains. *BMC Microbiology*, 12:88, doi: 10.1186/1471-2180-12-88: 20 str.

Pereyre S., Gonzales P., de Barbeyrac B., Daringe A., Renaudin H., Charron A., Raherison S., Bebear C., Bebear C. M. 2002. Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance to macrolides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 10: 3142-3150

Pereyre S., Pharm D. 2014. *Mycoplasma* species (*M. hominis*, *M. genitalium*, *M. fermentans*). Dayton, Antimicrobe.org: 7 str.

<http://www.antimicrobe.org/new/m06.asp> (10. september, 2015)

Pereyre S., Renaudin H., Charron A., Bebear C., Bebear C. M. 2006. Emergence of a 23S rRNA mutation in *Mycoplasma hominis* associated with a loss of intrinsic resistance to erythromycin and azithromycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 753-756

Pereyre S., Sinrad-Pugnet P., Beven L., Charron A., Renaudin H., Barre A., Avenaoud P., Jacob D., Coloux A., Barbe V., de Daruvar A., Blanchard A., Bebear C. 2009. Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. *PLOS genetics*, 5, 10: e1000677, doi: 10.1371/journal.pgen.1000677: 16 str.

- Ponyai K., Mihalik N., Ostorhazi E., Farkas B., Parducz L., Marschalko M., Karpati S., Rozgonyi F. 2013. Incidence and antibiotic susceptibility of genital mycoplasmas in sexually active individuals in Hungary. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 32: 1423-1426
- Read A. F., Woods R. J. 2014. Antibiotic resistance management. *Evolution, Medicine and Public health*, 2014: 147, doi: 10.1093/emph/eou024: 1 str.
- Redelinghuys M. J., Ehlers M. M., Dreyer A.W., Lombaard H.A., Kock M. M. 2013. Comparison of new mycofast revolution assay with a molecular assay for the detection of genital mycoplasmas from clinical specimens. *BMC Infectious Diseases*, 13: 453, doi: 10.1186/1471-2334-13-453: 6 str.
- Redelinghuys M. J., Ehlers M. M., Dreyer A.W., Lombaard H. A., Kock M. M. 2014. Antimicrobial susceptibility patterns of *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* in pregnant women. *BMC Infectious Diseases*, 14: 171, doi: 10.1186/1471-2334-14-171: 6 str.
- Song T., Ye A., Xie X., Huang J., Ruan Z., Kong Y., Song J., Wang Y., Chen J., Zhang J. 2014. Epidemiological investigation and antimicrobial susceptibility analysis of ureaplasma species and *Mycoplasma hominis* in outpatients with genital manifestations. *Journal of Clinical Pathology*, 67: 817-820
- Taylor-Robinson D., Lamont R. F. 2011. Mycoplasmas in pregnancy. *International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 118, 2: 164-174
- Waites K. B., Duffy L. B., Bebear C., Matlow A., Talkington D. F., Kenny G. E., Totten P. A., Bade D. J., Zheng X., Davidson K. M., Shortridge V. D., Watts J. L., Brown S. D. 2012b. Standardized methods and quality control limits for agar and broth microdilution susceptibility testing of *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 11: 2592-2597
- Waites K. B., Katz B., Schelonka R. L. 2005. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 18: 757-789
- Waites K. B., Xiao L., Paralanov V., Viscardi R. M., Glass J. I. 2012a. Molecular methods for the detection of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* infections in humans. *Journal of Molecular Diagnostics*, 14, 5: 437-450

- Xiao L., Crabb D. M., Duffy L. B., Paralanov V., Glass J. I., Hamils D. L., Waites K., B. 2011. Mutations in ribosomal proteins and ribosomal RNA confer macrolide resistance in human *Ureaplasma* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37: 377-379
- Ye G., Jiang Z., Wang M., Huang J., Jin G., Lu S. 2014. The resistance analysis of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in female reproductive tract specimens. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 68: 207-210
- Zhang Q., Wise K.S. 1996. Molecular basis of size and antigenic variation of a *Mycoplasma hominis* adhesin encoded by divergent *vaa* gene. *Infection and Immunity*, 64, 7: 2737-2744
- Zimmerman C. U. R., Rosengarten R., Spargser J. 2013. Interaction of the putative tyrosine recombinases RipX (UU145), XerC (UU222), and CodV (UU529) of *Ureaplasma parvum* serovar 3 with specific DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 340: 55-64

ZAHVALA

Najprej se želim zahvaliti mentorici doc. dr. Darji Keše za navodila, strokovno vodenje, koristne nasvete, pomoč pri izvedbi magistrske naloge ter za hitro in natančno popravo magistrskega dela. Prav tako se ji želim zahvaliti za spodbudne besede in razumevanje. Iskrena hvala tudi prof. dr. Darji Žgur-Bertok za hitro recenzijo.

Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim v Laboratoriju za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami, predvsem Roku Kogoju za njegovo uvajanje v laboratorijsko delo, pomoč in obrazložitve.

Najlepša hvala tudi moji družini, mami, očetu in sestri Žani ter vsem prijateljem za vso pomoč in podporo tekom mojega študija.

PRILOGE

Priloga A: Jakost produkta PCR, rast v tekočem gojišču 10B in CFU/mL za vzorce bolnikov z dokazano okužbo z *Ureaplasma* spp.

MBL št. vzorca	Jakost produkta PCR	Rast v tekočem gojišču 10B	Rast na trdnem A8 gojišču- CFU/mL
31/13	+	+	/
205/13	±	+	/
207/13	+++	+	/
247/13	++	+	6x10 ⁴ (Iz 10B ni rasti)
338/13	±	+	1,15x10 ⁶
383/13	++	+	2,85x10 ⁶
678/13	+++	+	1,05x10 ⁷
841/13	±	+	2x10 ⁴
847/13	+	+	1,95x10 ⁶
850/13	+	+	2,1x10 ⁴ + glive
853/13	±	+	3,85x10 ⁶
977/13	+	+	6,55x10 ⁶
982/13	+	+	8,55x10 ⁶
1129/13	+	+	1,24x10 ³
1130/13	++	+	8,95x10 ⁶
1132/13	++	+	1,05x10 ⁷
1273/13	+++	+	5,2x10 ⁶
1413/13	+++	+	1,03x10 ⁷
1417/13	+++	+	/
1419/13	±	+	2,7x10 ⁶
1565/13	+++	+	/
1567/13	+++	+	4,70x10 ⁶
1569/13	++	+	7,70x10 ⁶
1832/13	++	+	4,45x10 ⁶
1834/13	++	+	2,25x10 ⁷

Se nadaljuje

Nadaljevanje Priloge A: Jakost produkta PCR, rast v tekočem gojišču 10B in CFU/mL za vzorce bolnikov z dokazano okužbo z *Ureaplasma* spp.

MBL št. vzorca	Jakost produkta PCR	Rast v tekočem gojišču 10B	Rast na trdnem A8 gojišču- CFU/mL
1838/13	+	+	1,21x10 ⁷
1862/13	+	-	/
1967/13	+	+	3,25x10 ⁶
1969/13	+++	+	Glive
1971/13	+++	+	5,25x10 ⁶
2227/13	+++	+	3x10 ²
2264/13	+++	+	2,8x10 ⁴
2284/13	±	+	2,4x10 ²
2424/13	+	+	2,6x10 ⁷
2428/13	+++	+	/
2430/13	+++	+	1,1x10 ⁷
2714/13	+++	+	/
2776/13	+++	+	/
2928/13	++	+	7,85x10 ³
2934/13	+++	+	5,60x10 ⁶
2064/13	+++	+	/
3199/13	+++	+	/
3201/13	+	+	6x10 ¹
3203/13	++	+	4,14x10 ⁶
3205/13	+++	+	2,80x10 ⁶
3447/13	++	+	1,1x10 ⁷
3449/13	+++	+	3,85x10 ⁶
3453/13	+	+	1,15x10 ⁵
3455/13	+++	+	Glive
3640/13	±	+	2,65x10 ⁶
3695/13	++	+	1,7x10 ³ + glive
4826/13	++	+	/
4969/13	+	+	5,15x10 ⁶

Se nadaljuje

Nadaljevanje Priloge A: Jakost produkta PCR, rast v tekočem gojišču 10B in CFU/mL za vzorce bolnikov z dokazano okužbo z *Ureaplasma* spp.

MBL št. vzorca	Jakost produkta PCR	Rast v tekočem gojišču 10B	Rast na trdnem A8 gojišču- CFU/mL
4971/13	++	+	/
5095/13	++	+	2,1x10 ³
5097/13	+++	+	1,4x10 ⁷
5099/13	+	+	2,15x10 ⁶
5104/13	++	-	6x10 ¹
5255/13	±	+	/
5257/13	++	+	8,65x10 ⁶
5259/13	+++	+	5,35x10 ⁶
5261/13	+++	+	3,2x10 ⁶
5499/13	+	+	1,4x10 ⁷
5616/13	±	+	/
5620/13	++	+	7,9x10 ⁶
5622/13	++	+	Glive
5865/13	+++	+	2,3x10 ⁷
5867/13	++	+	/
5992/13	++	+	/
6100/13	+++	+	/
6280/13	++	+	6,65x10 ⁵
6282/13	++	+	8x10 ¹
6559/13	+	+	1,1x10 ⁷
6694/13	++	+	/
128/14	+++	+	Glive
584/14	+++	+	6,7x10 ⁶
586/14	+++	+	5x10 ⁶
591/14	+++	-	/
728/14	++	+	Motno (glive)
732/14	+	-	/
913/14	++	+	6,15x10 ⁶

Se nadaljuje

Nadaljevanje Priloge A: Jakost produkta PCR, rast v tekočem gojišču 10B in CFU/mL za vzorce bolnikov z dokazano okužbo z *Ureaplasma* spp.

MBL št. vzorca	Jakost produkta PCR	Rast v tekočem gojišču 10B	Rast na trdnem A8 gojišču- CFU/mL
917/14	+++	+	/
1184/14	+++	+	8,85x10 ⁶
1186/14	++	+	Motno (glive)
1188/14	+++	+	6x10 ⁶
1361/14	+	+	7,4x10 ² + glive
1367/14	++	+	/
1507/14	++	+	/
1645/14	±	+	1x10 ⁶
1647/14	++	+	Glive (ko smo nacepili 100 µL)
1649/14	++	+	3,1x10 ⁶
1651/14	++	+	/
1791/14	+	+	5x10
1793/14	±	+	/
2195/14	++	+	/
2316/14	+	+	6,3x10 ³
2320/14	++	+	/
2530/14	+	+	/
2534/14	±	+	Glive
2683/14	++	+	/
2685/14	+	+	Zelo veliko gliv
2687/14	++	+	/
2689/14	+++	+	/
2815/14	+	+	Glive
2819/14	++	+	/

Legenda: Z **zeleno** barvo so označeni vzorci, ki so na trdnem gojišču A8 zrasli iz osnovne kužnine in ne iz pozitivnega gojišča 10B. +++-najmočnejša, ±-najšibkejša reakcija PCR. + rast in – ni rasti v tekočem 10B gojišču, /-ni rasti na trdnem gojišču A8.