

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Mateja JOVANOVIĆ

GENOTIPIZACIJA BAKTERIJE
Mycoplasma pneumoniae

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2.stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Mateja JOVANOVIĆ

GENOTIPIZACIJA BAKTERIJE *Mycoplasma pneumoniae*

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

GENOTYPING OF BACTERIA *Mycoplasma pneumoniae*

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze 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.

Mateja Jovanović

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du2
DK UDK 579.61:616-036.22:579.887:577.2.088(043)=163.3
KG mikoplazme/*Mycoplasma pneumoniae*/epidemija atypične pljučnice/
genotipizacija/sekvenciranje/pirosekvenciranje/adhezin P1/sekvenčni tip
AV JOVANOVIĆ, Mateja, 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 GENOTIPIZACIJA BAKTERIJE *Mycoplasma pneumoniae*
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
OP IX, 65 str., 12 pregl., 21 sl., 118 vir.
IJ Sl
JI sl/en
AI Bakterija *Mycoplasma pneumoniae* je povzročiteljica atypične pljučnice pri ljudeh,
ki se na gostiteljeve celice veže z membranskim adhezinom P1. Raznolikost
slednjega omogoča tipizacijo bakterije na tip 1 in tip 2. Značilnost okužb z
bakterijo *M. pneumoniae* je, da se epidemije pojavljajo na 3-7 let in trajajo 1-2 leti.
Študije v zadnjih letih so pokazale na pojav epidemije v Evropi med letoma 2010
in 2012, dodatne genotipizacije pa tudi prevlado bakterije tipa 1 tekom te
epidemije. V nalogi nas je zanimalo, ali je tudi v Sloveniji prišlo do epidemije
okužb z bakterijo *M. pneumoniae* v tem času in kateri tip jo je povzročil. Bakterije
izolirane iz kužnin bolnikov z atypično pljučnico med letoma 2006 in 2013 smo
genotipizirali z metodo pirosekvenciranja. Pirosekvencirali smo dva gena za
katera je značilen polimorfizem posameznega nukleotida, gen MPN141, ki kodira
adhezin P1, in gen MPN528a. Rezultati so pokazali epidemijo v Sloveniji med
novembrom 2009 in koncem februarja 2011. Z genotipizacijo pa smo dokazali
prevlado tipa 2 pred epidemijo in med epidemijo (več kot 70 %), ki se je ohranila
tudi po koncu epidemije. Leta 2013 je prišlo do zamenjave prevladujoče tipa (2/3
okužb je povzročil tip 1), povečevalo pa se je tudi število okužb, kar je nakazovalo
morebitno novo epidemijo okužb z bakterijo *M. pneumoniae*.

KEY WORD DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2
DC UDC 579.61:616-036.22:579.887:577.2.088(043)=163.3
CG micoplasmas/*Mycoplasma pneumoniae*/epidemic of atypical pneumonia/genotyping/sequencing/pyrosequencing/adhesin P1/sequence type
AU JOVANOVIĆ, Mateja
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 GENOTYPING OF BACTERIA *Mycoplasma pneumoniae*
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO IX, 65 p., 12 tab., 21 fig., 118 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Bacterium *Mycoplasma pneumoniae* is a causative agent of atypical bacterial pneumonia. A part of bacterial membrane is adhesin P1 that enables adhesion to epithelial cells and its diversity allows typing bacteria on type 1 and type 2. Epidemics of infections with bacteria *M. pneumoniae* occurs every 3-7 years and they last 1-2 years. Studies in the past showed the epidemic in Europe between 2010 and 2012, the additional genotyping revealed the predominance of bacteria *M. pneumoniae* type 1 during the epidemic. In our study we were interested in whether there was an epidemic in Slovenia and which type caused it. We studied isolates of bacteria from the patients with atypical pneumonia between the year 2006 and 2013. We genotyped bacteria with pyrosequencing two gens with the single nucleotide polymorphism, gen MPN141 for adhesin P1 and gen MPN528a. The results showed epidemic in Slovenia between November 2009 and February 2011. With genotyping we have demonstrated the predominance of type 2 before and during the epidemic (over 70%), which was maintained even after the end of the epidemic. In 2013 there was a type-shift (2/3 infections was caused by type 1) and the increase in the number of infections, which suggested a possible new outbreak of infection with the bacterium *M. pneumoniae*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	III
KEY WORD DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 TAKSONOMIJA MIKOPLAZEM	3
2.2 POMEMBNJEŠE BAKTERIJE RODU <i>MYCOPLASMA</i> , KI POVZROČAJO OKUŽBE PRI LJUDEH.....	3
2.3 MIKOPLAZME, KI POVZROČAJO OKUŽBE PRI ŽIVALIH IN RASTLINAH.	5
2.4 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ IZ DRUŽINE <i>MYCOPLASMATACEAE</i>	7
2.5 ZNAČILNOSTI BAKTERIJE <i>MYCOPLASMA PNEUMONIAE</i>	9
2.6 GENOM BAKTERIJE <i>MYCOPLASMA PNEUMONIAE</i>	11
2.6.1 Gen MPN141.....	14
2.6.2 Gen MPN528a.....	14
2.7 VIRULENTNI DEJAVNIKI BAKTERIJE <i>MYCOPLASMA PNEUMONIAE</i>	15
2.8 PATOGENEZA.....	17
2.8.1 Imunski odziv gostitelja	18
2.9 BOLEZNI, KI JIH POVZROČA BAKTERIJA <i>MYCOPLASMA PNEUMONIAE</i>	19
2.10 EPIDEMIOLOGIJA	20
2.10.1 Pojavnost epidemij v Evropi in po svetu	21
2.11 ZDRAVLJENJE OKUŽB Z BAKTERIJO <i>MYCOPLASMA PNEUMONIAE</i>	24
2.12 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA	25
2.12.1 Neposredne metode dokazovanja okužb z bakterijo <i>Mycoplasma pneumoniae</i>.....	25
2.12.1.1 Metode osamitve bakterije <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	25
2.12.1.2 Metoda PCR.....	25
2.12.2 Posredne metode dokazovanja okužb z bakterijo <i>Mycoplasma pneumoniae</i>.....	26

2.12.2.1	Serologija	26
2.13	TIPIZACIJA BAKTERIJE <i>MYCOPLASMA PNEUMONIAE</i>	26
3	MATERIALI IN METODE	30
3.1	MATERIALI	30
3.1.1	Bakterijski izolati	30
3.1.2	Gojišča	31
3.1.3	Reagenti	31
3.1.4	Začetni oligonukleotidi.....	31
3.1.5	Oprema.....	31
3.2	SHEMA DELA	33
3.3	METODE	34
3.3.1	Izolacija DNA.....	34
3.3.2	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	34
3.3.3	Elektroforeza DNA v agaroznem gelu.....	35
3.3.4	Pirosekvinciranje	35
3.3.4.1	Obdelava podatkov in genotipizacija.....	36
4	REZULTATI	37
4.1	REAKCIJA PCR GENOV MPN141 IN MPN528A.....	37
4.2	GENOTIPIZACIJA BAKTERIJE <i>MYCOPLASMA PNEUMONIAE</i> S PIROSEKVCIRANJEM	38
4.3	DEMOGRAFSKE ZNAČILNOSTI ANALIZIRANIH IZOLATOV.....	39
4.4	EPIDEMIJA V SLOVENIJI.....	42
5	RAZPRAVA	47
6	SKLEPI	51
7	POVZETEK.....	52
8	VIRI.....	54
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Taksonomska uvrstitev bakterije <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (Brown in sod., 2010)	3
Pregl. 2: Mikoplazme, ki parazitirajo pri ljudeh (Keše in sod., 2014; Waites in sod., 2004; Gillespie in sod., 2015)	4
Pregl. 3: Najpomembnejše mikoplazme in bolezni, ki jih povzročajo, pri živalih	6
Pregl. 4: Zbrani podatki o epidemijah okužb z bakterijo <i>Mycoplasma pneumoniae</i> v Evropi in na Japonskem	23
Pregl. 5: Zbrani podatki opravljenih epidemioloških študij o pojavnosti in prevladujočem tipu bakterije <i>Mycoplasma pneumoniae</i> v zadnjih 70 letih.....	23
Pregl. 6: Značilnosti vzorcev uporabljenih v raziskavi	30
Pregl. 7: Reakcijska mešanica za pomnoževanje dela gena MPN141	34
Pregl. 8: Reakcijska mešanica za pomnoževanje dela gena MPN528a	34
Pregl. 9: Amplifikacijski pogoji za gen MPN141	35
Pregl. 10: Amplifikacijski pogoji za gen MPN528a	35
Pregl. 11: Število pripadnikov posameznega spola v posamezni starostni skupini	41
Pregl. 12: Razporeditev števila okužb s posameznim tipom bakterije <i>Mycoplasma pneumoniae</i> po letih in starostnih skupinah.....	45

KAZALO SLIK

Sl. 1: Zgradba pritrjevalnega terminalnega organela bakterije <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (Waites in sod., 2008).....	10
Sl. 2: Shematski izgled kolonije bakterije <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (Razin, 1996)	11
Sl. 3: Mapiran genom bakterije <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (Catrein in sod., 2011).....	12
Sl. 4: Interakcije med bakterijo <i>Mycoplasma pneumoniae</i> in gostiteljevimi celicami (Saraya in sod., 2014)	18
Sl. 5: Potek pirosekvinciranja (Ahmadian in sod., 2006)	29
Sl. 6: Shema poteka dela	33
Sl. 7: Delež uspešno kultiviranih vzorcev bakterije <i>Mycoplasma pneumoniae</i> v posameznem letu	37
Sl. 8: Primer elektroforeze produktov gena MPN141 petih vzorcev s pozitivno in negativno kontrolo ob markerju 100 bp	38
Sl. 9: Primer elektroforeze produktov gena MPN528a petih vzorcev s pozitivno in negativno kontrolo ob markerju 100 bp	38
Sl. 10: Primer piktografa genotipizacije gena MPN141 bakterije <i>Mycoplasma pneumoniae</i> tip 1	39
Sl. 11: Primer piktografa genotipizacije gena MPN528a bakterije <i>Mycoplasma pneumoniae</i> tip 2	39
Sl. 12: Delež pripadnikov posameznega spola v naši raziskavi okuženih z bakterijo <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	40
Sl. 13: Porazdelitev okuženih bolnikov z bakterijo <i>Mycoplasma pneumoniae</i> po starostnih skupinah.....	40
Sl. 14: Razmerje spolov okuženih v različnih starostnih skupinah.....	41
Sl. 15: Število dokazanih okužb z <i>Mycoplasma pneumoniae</i> s testom PCR pri moških in ženskah v posameznem letu	42
Sl. 16: Število pozitivnih vzorcev s testom PCR med letoma 2006 in 2013.....	42
Sl. 17: Gibanje števila pozitivnih vzorcev z metodo PCR med epidemijo okužb z bakterijo <i>Mycoplasma pneumoniae</i> od novembra 2009 do februarja 2011.....	43
Sl. 18: Število okuženih s posameznim tipom <i>Mycoplasma pneumoniae</i> med letom 2006 in 2013	44
Sl. 19: Delež posameznega tipa <i>Mycoplasma pneumoniae</i> pred epidemijo, med njo in po koncu epidemije.....	44
Sl. 20: Rezultat pirosekvinciranja gena MPN141 pri vzorcu 331/11	45
Sl. 21: Epidemija okužb z bakterijo <i>Mycoplasma pneumoniae</i> v Evropi med letoma 2009 in 2012.....	46

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	adenin
ATP	adenozin trifosfat (angl. adenosine triphosphate)
BAL	bronhoalveolarna lavaža
bp	bazni par
C	citozin
DGGE	Gelska elektroforeza z denaturirajočim gradientom (angl. denaturing gradient gel electrophoresis)
ELISA	encimsko imunski test (angl. enzyme linked immunosorbent assays)
G	gvanin
HMW	molekule z veliko molekularno težo (angl. high molecular weight)
kDa	kilodalton, enota atomske mase
<i>M. pneumoniae</i>	bakterija <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
MLVA	analiza multiplih lokusov za tandemske ponovitve DNK v spremenljivem številu (angl. Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis)
mol%	molski odstotek
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PFGE	elektroforeza v pulzirajočem polju (angl. pulsed field gel electrophoresis)
RAPD	metoda naključno pomnožene polimorfne DNA (angl. random amplified polymorphic DNA)
RFLP	metoda polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphism)
rRNA	ribosomska ribonukelinska kislina
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida (angl. single nucleotide polymorphism)
T	timin

1 UVOD

Bakterija *Mycoplasma pneumoniae* povzroča 2 – 18 % zunajbolnišničnih pljučnic (Mušič in sod., 2010). Klinični znaki okužbe so vse od blagih simptomov do razvoja atypične pljučnice in zapletov. Prvi klinični znaki se pojavijo šele tri tedne po okužbi in so večinoma nespecifični (Jacobs, 2002). Stopnja endemičnih pljučnic povzročenih z bakterijo *M. pneumoniae* je najvišja pri otrocih med 5. in 14. letom starosti (Foy, 1993).

Za *M. pneumoniae* je značilno, da povzroča epidemije, ki se ponavljajo na 3 – 7 let in trajajo 1 do 2 leti (Kenri in sod., 2008). Glede na periodično pojavljanje epidemij lahko sklepamo, da se čredna imunost populacije ohrani približno 4 leta. Nato so ljudje ponovno dovzetni za okužbe z bakterijo in lahko pride do nove epidemije (Jacobs, 2012).

Ključni virulentni dejavnik bakterije je terminalni organel, ki omogoča pritrjevanje na gostiteljeve celice. Sestavlja ga glavni adhezin P1 in mnoge druge pomožne beljakovine. Glede na genski zapis za adhezin P1 lahko bakterijo *M. pneumoniae* ločimo na tip 1 in tip 2. Raziskave kažejo, da je tip adhezina lahko pomemben pri oblikovanju bakterijskih kolonij in tudi pri imunskega odziva gostitelja. Pacienti, ki so preboleli okužbo z bakterijo *M. pneumoniae*, imajo inhibitorno aktivnost, ki prepreči vezavo bakterije na eritrocite. To verjetno služi kot način imunosti, ki zmanjša možnost ponovne okužbe in je lahko tipsko specifičen za določen tip adhezina P1 (Sasaki in sod., 1996; Waites in Talkington, 2004; Simmons in sod., 2013).

Genotipizacija je metoda pomembna za razumevanje epidemioloških značilnosti bakterije, saj omogoča spremljanje pojavnosti okužb z različnimi tipi *M. pneumoniae* (Lenglet in sod., 2012). Študije so pokazale na korelacijo med izbruhi epidemij in zamenjavo prevladajočega tipa v populaciji. Prevlada enega tipa se nato lahko ohrani nekaj let (Kenri in sod., 2008).

1.1 NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je bila genotipizacija bakterije *M. pneumoniae* izolirane iz kužnin bolnikov z okužbami dihal med letoma 2006 in 2013. Prav tako smo želeli spoznati epidemiologijo okužb z bakterijo *M. pneumoniae* v Sloveniji od leta 2006 do leta 2013.

Cilji naloge:

- ugotoviti smo želeli epidemiologijo okužb z bakterijo *M. pneumoniae* v obdobju med letoma 2006 in 2013;
- spoznati želimo, kateri tip bakterije *M. pneumoniae* je v našem okolju najbolj razširjen;
- glede na podatke iz literature nas zanima, ali je bila v Sloveniji epidemija okužb z bakterijo *M. pneumoniae* v obdobju med letoma 2006 in 2013;
- s primerjavo podatkov želimo ugotoviti, ali se prevladujoči tip *M. pneumoniae* v času epidemije v Sloveniji ujema s tipom, ki je v tem času prevladoval in povzročil epidemijo v drugih evropskih državah.

Delovne hipoteze:

- Predvidevamo, da je *tip M. pneumoniae*, ki je povzročil epidemijo okužb v Sloveniji leta 2010 enak tipu *M. pneumoniae*, ki je bil prevladujoč v istem času drugje po Evropi.
- Pričakujemo, da bomo opazili razlike v pojavnosti med tipi *M. pneumoniae*, ki so povzročali okužbe pred in med epidemijo ter po epidemiji leta 2010.

2 PREGLED OBJAV

Mikoplazme so najmanjši in najbolj preprosti organizmi, ki so še zmožni samostojnega razmnoževanja. Celice imajo zelo majhno število organelov, ki še zadostuje za celično rast in razmnoževanje: plazemska membrana, ki ločuje citoplazmo od oklice, ribosome za sestavljanje celičnih proteinov in dvostransko molekulo DNA z informacijami za sintezo proteinov (Razin, 1978).

Izraz mycoplasma izhaja iz grščine ("mykes" = gliva, "plasma" = oblikovan) (Waites in Talkington, 2003) in pomeni "oblikovan kot gliva". Čeprav podobnost z rastjo gliv velja le za bakterijo *Mycoplasma mycoides*, se je poimenovanje vseeno obdržalo vse do danes. V 60. letih prejšnjega stoletja so mikoplazme uvrstili v razred *Mollicutes* (latinsko: "mollis" = mehek, "cutis" = koža) (Waites in sod., 2004). Glavne značilnosti bakterij iz razreda *Mollicutes* so odsotnost celične stene, majhen genom, velik največ 2,2 Mbp, in nizka vsebnost citozina in gvanina (Johansson in Pettersson, 2002).

2.1 TAKSONOMIJA MIKOPLAZEM

Razred *Mollicutes* vsebuje 5 redov: *Mycoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales*, *Entomoplasmatales* in *Haloplasmatales* (pregl. 1). *Mycoplasma pneumoniae* je uvrščena v družino *Mycoplasmataceae* in red *Mycoplasmatales* (Waites in sod., 2003). V družino *Mycoplasmataceae* uvrščamo dva rodu: *Mycoplasma* in *Ureaplasma* (pregl. 1). Rod *Mycoplasma* vsebuje več 100 vrst na osnovi podobnosti sekvenč 16S rRNA, vključno z ekološko, fenotipsko in genetsko vezano skupino imenovano mycoides kluster s tipsko vrsto *Mycoplasma mycoides* (Brown in sod., 2010).

Preglednica 1: Taksonomska uvrstitev bakterije *Mycoplasma pneumoniae* (Brown in sod., 2010)

<i>Firmicutes</i>	<i>Tenericutes</i>	<i>Mollicutes</i>	<i>Mycoplasmataceae</i>	<i>Mycoplasma</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
				<i>Ureaplasma</i>	
			<i>Acholeplasmatales</i>		
			<i>Anaeroplasmatales</i>		
			<i>Entomoplasmatales</i>		
			<i>Haloplasmatales</i>		

2.2 POMEMBNEJŠE BAKTERIJE RODU MYCOPLASMA, KI POVZROČAJO OKUŽBE PRI LJUDEH

Med najbolj poznanimi in preučenimi mikoplazmami so vrste, ki so patogene za ljudi ali udomačene živali. Približno polovica znanih vrst je komenzalov, ki pa so lahko občasno oportunisti ali sekundarni patogeni. Trenutno je opisanih 17 vrst mikoplazem (pregl. 2), ki pri ljudeh kolonizirajo površine sluznic dihal in urogenitalnega sistema (Blanchard in Bébéar, 2002; Waites in sod., 2012; Gillespie in sod., 2015, Keše in sod., 2014). Glavni

človeški patogeni so bakterije *M. pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma fermentans* in *Mycoplasma genitalium* ter *Ureaplasma urealyticum* in *Ureaplasma parvum*. Bakterije *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma pirum* in *Mycoplasma amphoriforme* so dokazali predvsem pri imunsko kompromitiranih bolnikih (Waites in sod., 2012; Brown in sod., 2010; Waites and Talkington, 2005; Blanchard in Bébéar, 2002). Večina vrst je zunajceličnih, nekatere pa lahko preživijo znotraj celic. Te vrste so *M. pneumoniae*, *M. genitalium* in *M. penetrans* (Dallo in Baseman, 2000).

Preglednica 2: Mikoplazme, ki parazitirajo pri ljudeh (Keše in sod., 2014; Waites in sod., 2004; Gillespie in sod., 2015)

Mikroorganizem	Primarno mesto kolonizacije		Patogenost ^a
	Respiratorični trakt	Urogenitalni trakt	
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	+	-	Ne
<i>Mycoplasma amphoriforme</i>	+	-	?
<i>Mycoplasma buccale</i>	+	-	Ne
<i>Mycoplasma faecium</i>	+	-	Ne
<i>Mycoplasma fermentans</i>	+	+	Da?
<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	+	Da
<i>Mycoplasma hominis</i>	-	+	Da
<i>Mycoplasma lipophilum</i>	+	-	Ne
<i>Mycoplasma orale</i>	+	-	Ne
<i>Mycoplasma penetrans</i>	-	+	?
<i>Mycoplasma pirum</i>	?	?	Ne
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	+	-	Da
<i>Mycoplasma primatum</i>	+	+	Da
<i>Mycoplasma salivarium</i>	+	-	Ne
<i>Mycoplasma spermatophilum</i>	-	+	Ne
<i>Ureaplasma parvum</i>	-	+	Da
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-	+	Da

+ prisoten, ? vprašljivo, - ni prisoten

^apri imunokompetentnih osebah

Bakterija *M. pneumoniae* je glavni povzročitelj zunajbolnišničnih pljučnic, bronhitisa in drugih obolenj dihal (Atkinson in sod., 2008). Okužbe z bakterijo *M. pneumoniae* so povezane tudi z zapleti v centralnem živčnem sistemu, krvožilnem sistemu in s kožnimi spremembami (Brown in sod., 2010).

Komeznalne mikoplazme v ustni votlini in grlu se običajno ne razširijo na spodnja dihala, a bakterijo *M. fermentans* so dokazali tudi v spodnjih dihalih pri imunsko oslabljenih odraslih s sindromom akutne dihalne stiske (Lo in sod., 1993). Ravno tako je bila dokazana v žrelu otrok s pljučnico, pri katerih ni bil ugotovljen noben drug povzročitelj, in v bronhoalveolarnem izpirku pri bolnikih z AIDSom, ki so prebolevali pljučnico (Taylor-Robinson, 1996). Bakterija *M. fermentans* lahko povzroča okužbe tako pri imunsko oslabljenih bolnikih kot pri bolnikih z normalnim imunskim sistemom (Blanchard in Bébéar, 2002).

Sečila in spolovila kolonizira sedem različnih vrst mikoplazem, od katerih pa so le bakterije *M. hominis*, *M. genitalium* in *Ureaplasma* spp. povzročiteljice okužb. Bakterije *Ureaplasma* spp. so prisotne pri 50 % zdravih žensk in bakterija *M. hominis* pri manj kot 10 % žensk (Blanchard in Bébéar, 2002). *Ureaplasma* spp. in *M. genitalium* povzročata vnetje sečnice pri moških (Brown in sod., 2010; Robertson in Taylor-Robinson, 2010) in vnetje sečil in spolovil pri ženskah (Blaylock in sod., 2004, Baseman in sod., 2004). Bakterija *M. hominis* je povezana z bakterijskim vnetjem nožnice, vendar so mehanizmi delovanja še neznani (Rosenstein in sod., 1996; Brown in sod., 2010). Študije kažejo na povezavo ureaplazem z okužbami sečnice, ki pa še ni dokazana (Potts in sod., 2000). Ureaplazme zmanjšujejo gibljivost spermijev in spremenijo njihovo morfologijo. Živalski modeli kažejo, da se ureaplazme lahko vežejo na spermije ali se celo vključijo v samo spermalno celico (Blanchard in Bébéar, 2002).

Ker so mikoplazme glavni povzročitelj artritisa pri mnogih živalskih vrstah, so njihovo vlogo pri vnetju sklepov preučevali tudi pri ljudeh. Do sedaj poznamo le nekaj primerov, ki dokazujejo povezavo med okužbo z mikoplazmami in artritisom pri ljudeh (Blanchard in Bébéar, 2002). Z artritisom povezujemo bakterije *M. hominis*, *Mycoplasma fermentans*, *M. genitalium*, *M. salivarium* in verjetno tudi *M. pneumoniae* pri juvenilnem artritisu (Waites in Talkington, 2005).

Obstaja tudi jasna povezava med okužbo z bakterijo *M. hominis* in septikemijo, okužbami dihal in tudi okužbami presajenih organov in sklepov pri imunsko oslabljenih (Brown in sod., 2010; Gass in sod., 1996; Hopkins in sod., 2002).

2.3 MIKOPLAZME, KI POVZROČAJO OKUŽBE PRI ŽIVALIH IN RASTLINAH

Mikoplazme kolonizirajo ribe, plazilce, ptice in sesalce. Nekatere povzročajo bolezni pri govedu in drugih prežvekovalcih, prašičih, perutnini in divjih živalih, pa tudi domačih ljubljenčkih, torej psih in mačkah (Brown in sod., 2010; Frey, 2002). Pomembne patogene mikoplazme pri živalih so zbrane v preglednici 3.

Preglednica 3: Najpomembnejše mikoplazme in bolezni, ki jih povzročajo, pri živalih

Gostitelj	Bakterijska vrsta	Bolezni	Vir
Govedo	<i>M. mycoides</i> podvrsta <i>mycoides</i>	goveja pljučnica z vnetjem poprsnice	Shahram in sod., 2010 Frey, 2002
	<i>M. bovis</i>	pljučnica, vnetje srednjega ušesa in vimen	Frey, 2002
Prašiči	<i>M. hyopneumoniae</i>	primarna enozootska pljučnica pri prašičih	Frey, 2002
Perutnina	<i>M. gallisepticum</i>	bolezni dihal, zmanjšana produkcia jajc	Bradbury in Morrow, 2008; Frey, 2002
	<i>M. synoviae</i>	vnetje sinovijске membrane, vnetje kit ali kitnih ovojnici, bolezni dihal	Bradbury in Morrow, 2008; Frey, 2002
	<i>M. meleagridis</i>	razvojne nepravilnosti in aerosakulitis	Bradbury in Morrow, 2008; Frey, 2002
Ovce in koze	<i>M. capricolum</i> podvrsta <i>capripneumoniae</i>	artiritis, vnetje vimen in pomanjkanje mleka	Frey, 2002
	<i>M. capricolum</i> podvrsta <i>capricolum</i>	artiritis, vnetje vimen in pomanjkanje mleka	Frey, 2002
	<i>M. mycoides</i> podvrsta <i>capri</i>	artiritis, vnetje vimen in pomanjkanje mleka	Manso-Silvan in sod., 2009; Frey, 2002
	<i>M. agalactiae</i>	artiritis, vnetje vimen in pomanjkanje mleka	Frey, 2002
	<i>M. conjunctivae</i>	vnetje veznice	Frey, 2002
Mačke in psi	<i>Haemobartonella canis</i>	vročina in slabokrvnost	Chalker, 2005; Sykes in Tasker, 2014;
	<i>Haemobartonella felis</i>	vročina in slabokrvnost	Maggi in sod., 2013
Glodavci	<i>M. arthritidis</i>	bolezni razmnoževalnih organov in sklepov	Frey, 2002; Brown in sod., 2010
	<i>M. pulmonis</i>	bolezni dihal	Frey, 2002

Bolezni dihal in sklepov pri glodavcih povzročata bakteriji *Mycoplasma pulmonis* in *Mycoplasma arthritidis*. Pomembni sta tudi kot raziskovalni model za preučevanje superantigenov vpletenih v vzbujanje vnetnih faktorjev in njihove vloge imunskega odziva pri ljudeh (Brown in sod., 2010; Frey, 2002). Bakterija *M. agalactiae* je močno razširjena predvsem v Sredozemlju, kjer povzroča velike izgube mleka pri kozah. Bakterija *Mycoplasma conjunctivae* povzroča vnetje veznice pri ovcah in gamsih v Alpah in lahko vodi v resno obolenje živali in njeni smrt. (Chalker, 2005; Bradbury in Morrow, 2008; Frey, 2002).

Najtesnejši stik z živalmi ima človek predvsem s hišnimi ljubljenčki. Pri slednjih najdemo hemotropne mikoplazme ali hemoplazme, ki se lahko prenašajo z vektorji z ljudi na žival in jih ne moremo gojiti ter so v gostitelju pritrjene na površino eritrocitov (Sykes in Tasker, 2014; Maggi in sod., 2013; Steer in sod., 2011). Imunsko oslabljeni ljudje so dovezetnejši za okužbe z zoonotskimi mikoplazmami. Pri bolnikih z okužbo HIV so potrdili okužbo z bakterijo podobno bakteriji *Mycoplasma haemofelis*, kar kaže na zoonotski potencial hemoplazem (dos Santos in sod., 2008). Dva pomembna hemotropna mikroorganizma sta

Haemobartonella canis in *Haemobartonella felis* (prej klasificirani v rod *Rickettsia* in zdaj na podlagi filogenetskih kriterijev preklasificirani v razred *Mollicutes*), prisotna pri psih in mačkah, ki povzročata vročino in slabokrvnost. Na podlagi filogenetskih študij so predlagali novo klasifikacijo *H. felis* kot *Candidatus Mycoplasma haemofelis* (Frey, 2002).

Prenos mikroorganizmov na človeka se lahko zgodi tako iz živali, kot tudi z rastline, kar še olajšajo vektorji. Prve študije povzročitelja rumenice rastlin so razkrile, da je v floemu okuženih rastlin pristona pleomorfna bakterija brez celične stene, ki je morfološko spominjala na mikoplazme. Tako so te bakterije najprej doobile ime mikoplazmam podobni organizmi (angl. mycoplasma-like organisms, MLO). Kasneje se je izkazalo, da te fitopatogene bakterije ni mogoče gojiti *in vitro* (Bertaccini in Duduk, 2009). Z molekularnimi metodami smo uspeli določiti status teh MLO med prokarionti in sledilo je oblikovanje novega taksona zanje imenovanega 'Candidatus phytoplasma' (IRPCM, 2004). Fitoplazme so zaradi pomanjkanja nekaterih metabolnih poti za sitezo živiljenjsko potrebnih celičnih sestavin obligatni paraziti v floemu rastlin in v nekaterih žuželkah. So pleomorfne bakterije manjše od 1 µm in z zelo majhnim genomom (680 – 1600 kbp). Fitoplazme se prenašajo z žuželkami iz družin Cicadellidae, Fulgoridae, Cixidae, Psyllidae, Delphacidae in Derbidae, ki se hranijo na floemu okuženih rastlin (Bertaccini in Duduk, 2009; Bai in sod., 2006). Pri rastlinah okuženih s fitoplazmami opazimo več simptomov, ki kažejo na porušeno ravnovesje rastnih faktorjev. To se izraža v razvoju zelenih listov v strukture namesto cvetov, sterilnosti cvetov, širjenju aksilarnih brstov v obliki "čarovničine metle" in splošen zastoj v razvoju (Bertaccini in Duduk, 2009).

V Sloveniji so predvsem pomembne fitoplazme, ki povzročajo karantenske bolezni. Ena takšnih je hrušev ožig jablan in hrušk, ki ga povzroča fitoplazma *European stone fruit yellows* (*Candidatus Phytoplasma prunorum*). Pomembna je tudi fitoplazma *Apple proliferation* (*Candidatus Phytoplasma mali*), ki povzroča metličavost jablan. Pri nas je pomemben vektor tudi bolšica vrste *Cacopsilla*, ki prenaša fitoplazmo *Pear decline* (*Candidatus Phytoplasma pyri*), ki povzroča odmiranje hrušk (Tehnološka navodila za integrirano pridelavo sadja, 2014; Seemüller in Schneider, 2004). Slovenija je tudi vinorodna dežela z mnogimi vinogradi, ki jih ogrožata predvsem dve fitoplazmi, ki se prenašata z ameriškim škržatkom. Fitoplazma *Grapevine Bois noir* povzroča navadno trsno rumenico ali rumenico počrnelosti lesa med tem ko zlato trsno rumenico povzroča fitoplazma *Grapevine flavescence dorée* (Značilnosti trsnih rumenic, 2009).

2.4 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ IZ DRUŽINE MYCOPLASMATACEAE

Bakterije iz družine *Mycoplasmataceae* so pleomorfne, običajno kokoidne celice s premerom 300 – 800 nm, lahko pa so tudi v obliki vitkih razvejanih filamentov. Oblika teh organizmov je lahko odvisna od osmotskega pritiska, kvalitete nutrientov v tekočem gojišču in faze rasti. Nekatere mikoplazme so filamentne v zgodnji fazi in eksponentni fazi rasti ali, ko so vezane na površino ozziroma na druge celice. Ta oblika je lahko prehodna in filamenti

se lahko razvejejo v verige kokov ali individualnih vegetativnih celic. Mnoge vrste so kokoidne in nikoli ne pridejo v filamentno fazo (Brown in sod., 2010). Nekatere celice imajo na enem polu strukturo, ki sodeluje pri adheziji na določeno površino. Pri vrstah *Mycoplasma mobile* in *Mycoplasma pneumoniae* je citoskelet osnova za zgradbo terminalnega organela, ki sodeluje pri adherenci in omogoča bakteriji polzeče gibanje (Brown in sod., 2010).

Celice so brez celične stene, obdane samo s plazemsko membrano. Bakterije se zaradi odsotnosti celične stene ne barvajo po Gramu. Odsotnost celične stene vpliva na odpornost organizmov na lizo z lizocimi in njihovo dovzetnost za lizo z osmotskim šokom ali z drugimi dejavniki, ki povzročijo lizo bakterijskega protoplasta (Razin, 1979, 1983).

Mikoplazme tvorijo kolonije, ki so običajno manjše od 1 mm v premeru, medtem ko so kolonije bakterij iz rodu *Ureaplasma* še manjše. Tipična kolonija ima izgled jajca na oko ali glave cvetače. Mikoplazme so običajno negiblivi, katalaza negativni, aerobni ali fakultativni anaerobi, ki so kemo-organotrofi in uporabljajo sladkorje ali arginin kot vir energije, ureaplazme pa obvezno ureo. Optimalno rastejo pri 37 °C, a rastejo tudi v temperaturnem območju od 20 do 45 °C. Za rast potrebujejo holesterol ali sorodne sterole (Brown in sod., 2010).

Mikoplazme predstavljajo enega najbolj zahtevnih prokariontov glede hranil. Glede na uporabljen vir energije jih lahko ločimo na glikolitične in neglikolitične vrste. Neglikolitične katabolizirajo arginin po poti arginin deiminaze, ki jo sestavlja trije encimi: arginin deiminaza (ArcA), ki hidrolizira arginin v cirtulin in amonijak; ornitine karbamoiltransferaza (ArcB), ki pretvori citrulin v prisotnosti fosfata v ornitin in karbamoilfosfat; in karbamat kinaza (ArcC), ki sintetizira ATP iz karbamoilfosfata in ADP. Bakterija *M. pneumoniae* ni zmožna pridobivanja ATP po tej poti, saj nima encimov ArcA in ArcB, gen MPN307, ki kodira karbamat kinazo pa je prisoten v celoti (Brown in sod., 2010; Rechnitzer in sod., 2013).

Najdemo jih pri vretenčarjih, kjer so lahko tako komenzali kot tudi patogene bakterije. Genom je velik od 580 do 1350 kbp. Tipski rod je rod *Mycoplasma*, ki ga je prvi opisal Nowak leta 1929 (Brown in sod., 2010).

Bakterije iz rodu *Ureaplasma* spp. so kokoidne celice velike približno 500 nm v premeru, ki so lahko v eksponentni fazi rasti v obliki kokobacilov. Ureaplazme so negiblivi fakultativno anaerobni kemoorganotrofi. Na trdnem gojišču oblikujejo majhne kolonije v obliki jajca na oko ali glave cvetače z nagubanim robom. Za rast potrebujejo vrednost pH od 6,0 do 6,5 in temperaturo med 35 in 37 °C. Bakterije rodu *Ureaplasma* nimajo od kisika odvisne oksidazne aktivnosti NADH in heksokinaze ali arginin deiminaze. Poimenovanje rodu izhaja iz posebne in obligatne potrebe po urei, ki jo z ureazami hidrolizirajo v ogljikov dioksid in

amonijak. V vretenčarjih, predvsem pticah in sesalcih, so prisotne kot komenzali ali oportunistični patogeni. Velikost genoma je od 760 do 1170 kbp. Sam genom vsebuje od 25 – 30 mol% gvanina in citozina. Tipska vrsta rodu je *Ureaplasma urealyticum*, ki so jo Shepard in sodelavci prvič opisali leta 1974 (Robertson in Taylor-Robinson, 2010).

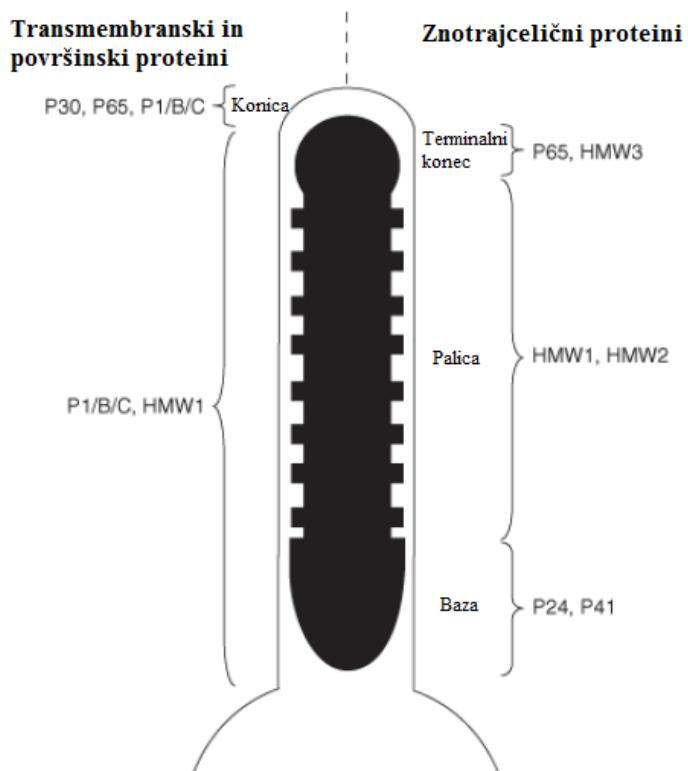
2.5 ZNAČILNOSTI BAKTERIJE *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

Prvi opisi bakterije *M. pneumoniae* segajo v 40. leta prejšnjega stoletja. Bakterijo je prvič izoliral Eaton s sodelavci leta 1944 iz tkivne kulture iz izmečka pacienta z atipično pljučnico. Takrat so jo imenovali Eatonov agens (Eaton in sod., 1944). Testi na prostovoljcih in študije izvedene v 50. in zgodnjih 60. letih so pokazale, da Eatonov agens povzroča okužbe spodnjih dihal pri človeku. Sprva so Eatonov agens obravnavali kot virus, dokler niso ugotovili, da je občutljiv za antibiotike. Leta 1961 sta Marmion in Goodburn objavila, da je Eatonov agens PPLO (angl. pleuropneumonia-like organisms) (Waites in Talkington, 2004). Dve leti kasneje so Eatonov agens uspešno kultivirali na bakteriološkem gojišču in Somerson, Taylor-Robinson in Chanock so v tem času predlagali novo preimenovanje v *M. pneumoniae* (Chanock in sod., 1963).

Celice so zelo pleomorfne. Prevladujoča oblika ima dolge in tanke terminalne strukture, z ali brez filimenta na nasprotnem polu. Bakterije so gibljive in drsijo v smeri terminalnega organela, kadar so pritrjene na celično površino, plastiko ali steklo.

Pri bakteriji *M. pneumoniae* so na celotni površini terminalnega organela prisotni adhezini. Glavna adhezinska beljakovina je adhezin P1, ki pa sam ne zadošča za pritrditev bakterije na gostitelje celice. Za citoadherenco so tako potrebne dodatne beljakovine (sl. 1). Ena od teh je beljakovina P30, proti kateri lahko nastanejo protitelesa, ki preprečijo vezavo bakterije na eritrocite. Beljakovina P30 je lahko povezana tudi z drsenjem bakterije in s koordinacijo celične delitve. Druge strukture povezane s citoadherenco so beljakovine HMW1, HMW2, HMW3, P200, P116, P90, P65 in druge pomožne beljakovine, kot sta elongacijski faktor TU in piruvat dehidrogenaza E1, ki se vežeta na fibronektin evkariontskih celic. Pri nastanku koničaste strukture za pritrjevanje je pomembno sestavljanje kompleksa beljakovin B, C in P1, ki zaključi oblikovanje terminalnega organela. Beljakovini B in C sta najverjetnejše produkta genov ORF6 v operonu P1. Gen, ki kodira beljakovino A, je še neznan. (Waites in sod., 2008; Himmelreich in sod., 1996; Wodke in sod., 2015; Chourasia in sod., 2014).

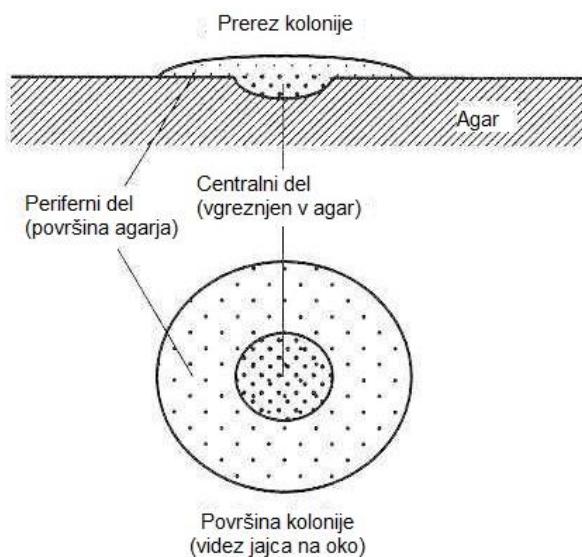
Nastanek in lokacija pritrjevalnega organela sta odvisna od citoskeletalnih proteinov, ki oblikujejo z elektroni bogato sredico v citoplazmi. Pred začetkom podvojevanja DNA se oblikuje drugi organel za pritrjevanje (Seto in sod., 2001). Gibalna sila, ki jo ustvarja prvi organel, prerazporedi celico tako, da je nov organel premaknjen na nasproti pol celice pred celično delitvijo. Pritrjevanje na evkariontske gostiteljske celice je pomembno za njeno preživetje in prenos mikoplazem (Hasselbring in sod., 2006).



Slika 1: Zgradba pritrjevalnega terminalnega organela bakterije *Mycoplasma pneumoniae* (Waites in sod., 2008)

Mycoplasma pneumoniae pridobiva energijo po glikolitični poti, pri kateri pa manjka cikel citronske kisline in celotna elektronska transportna veriga s citokromosomi, ravno tako je nepopolna pot pentoze fosfata (Dutow in sod., 2010; Waites in Talkington, 2004). Kot vir ogljika *M. pneumoniae* uporablja glukozo, fruktozo ali glicerol, ki jih metabolizira z glikolizo, pri čemer nastaja še majhna količina ATP (Dutow in sod., 2010; Miles, 1992; Brown in sod., 2010). Bakterija glukozo, fruktozo in glicerol katabolizira do piruvata, ki je nato pretvorjen v acetil-koencim A s kompleksom piruvat dehidrogenaze in na koncu v acetat s fosfotransacetilazo in acetat kinazo, pri čemer tekom celotne reakcije nastaneta dodatni dve molekuli ATP in dve molekuli NADH. *M. pneumoniae* pa lahko piruvat pretvori tudi v L-laktat z laktat dehidrogenazo, pri čemer se NADH oksidira v NAD. Slednja reakcija je še posebej pomembna, saj bakterija *M. pneumoniae* nima dihalne verige, ki bi omogočala oksidacijo NADH (Halbedel in sod., 2007).

Mycoplasma pneumoniae tvori kolonije na trdnem gojišču, ki izgledajo kot okrogle, kupulaste, granulirane strukture, v obliki jajca na oko (sl. 2). Najuspešneje jih gojimo v gojišču SP-4 z dodano glukozo pri 37 °C (Brown in sod., 2010).

Slika 2: Shematski izgled kolonije bakterije *Mycoplasma pneumoniae* (Razin, 1996)

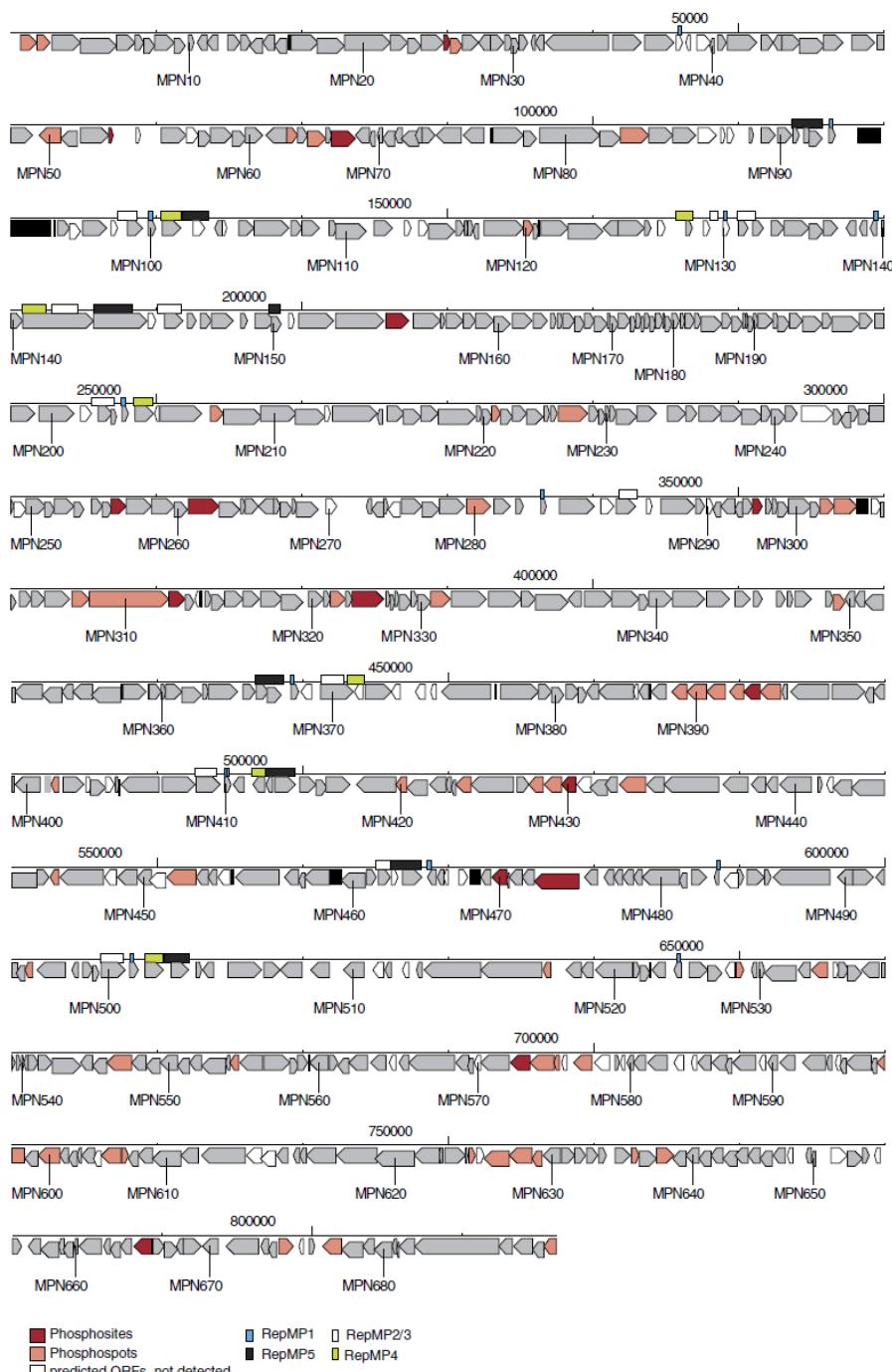
Bakterija *M. pneumoniae* je za človeka patogena. Prenaša se z aerosoli in povzroča faringitis, traheobronhitis in atipično pljučnico. Redkeje lahko tudi povzroči izvenpljučne okužbe, kot so vnetje možganov in možganskih ovojnici, srednjega ušesa, bobniča in sinovijske membrane, kožnosluznične lezije, vnetje glomerulov ledvic, trebušne slinavke, jeter, srčne mišice in perikardija. Lahko povzroči hemolitično anemijo in rabdomiolizo (Waites in Talkington, 2005). Pretiran odziv imunskega sistema na okužbo, s prekomernim odzivom citokinov ali z možno molekularno mimikrijo, povezujejo z dolgotrajnimi posledicami, vključno z razvojem astme, s kronično obstruktivno pljučno bolezniijo in s sindromom Stevens-Johnson in sindromom Guillain-Barré, z Bellovo paralizo in z demielinizacijsko nevropatijo (Atkinson in sod., 2008). Okužbe učinkovito zdravijo s tetraciklini, fluorokinoloni, makrolidi in linkozamidi (Waites in Talkington, 2005). Eksperimentalna cepljenja so se izkazala za neučinkovita, saj niso uspela izzvati imunskega odziva (Brown in sod., 2010).

2.6 GENOM BAKTERIJE *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

Bakterija *M. pneumoniae* je ena izmed bakterij z zelo majhnim genomom. Njen genom je velik le 816 394 bp in ima vsebnost gvanina in citozina 40,0 mol%. Leta 1996 so Himmelreich in sodelavci prvič določili nukleotidno zaporedje in anotirali gene. Štiri leta kasneje je njihovo delo dopolnil Dandekar s sodelavci.

Po končanem sekvenciranju genoma so predvideli 677 odprtih bralnih okvirjev (angl. Open reading frame, ORF), kasneje so jih določili 689, a le 458 odprtih bralnih okvirjem so ugotovili funkcijo glede na njihovo podobnost z geni ali proteini drugih organizmov z znano funkcijo ali kategorijo delovanja (sl. 3). Približno 8 % genoma bakterije sestavljajo ponavljajoči se elementi DNA označeni RepMP1, RepMP2/3, RepMP4 in RepMP5.

Nekateri deli genoma imajo visoko vsebnost gvanina in citozina, tudi do 56 mol%. Ti deli nosijo zapis skoraj izključno za gen P1 in gen ORF6 operona P1 ter ponavljajoče se sekvene DNA RepMP4, RepMP2/3, RepMP5. Znano je, da se izražajo le ponavljajoči se elementi znotraj gena P1, ostale kopije se ne izražajo. Izjema je element RepMP1, katerega kopije so del več izraženih proteinov (Himmelreich in sod., 1996; Dandekar in sod., 2000).



Slika 3: Mapiran genom bakterije *Mycoplasma pneumoniae* (Catrein in sod., 2011)

Sev FH bakterije *M. pneumoniae* ima druge kopije RepMP2/3, RepMP4 in RepMP5 v operonu P1 kot sev M129. Eksperimentalni podatki kažejo, da se izražajo le ponavljajoče se sekvene, ki so del operona P1 (Himmelreich in sod., 1996). Spuesens in sodelavci (2010) so za potrebe genotipizacije določili nukleotidno zaporedje gena MPN528a, kodirajočega homolog encimu RecU, ki sodeluje pri DNA rekombinaciji.

Bakterija *M. pneumoniae* je parazit, ki se pritrjuje na celice gostitelja, zato ima v genomu tudi zapis za beljakovine, ki sestavljajo terminalni organel za pritrjevanje. Najpomembnejši je gen MPN141, ki kodira glavni adhezin P1. Pomožni adhezivni beljakovini B in C sta najverjetneje produkta genov ORF6 v operonu P1. Geni MPN447, MPN310 in MPN452 nosijo zapis za molekule z veliko molekularno težo (angl. high molecular weight, HMW), ki so del terminalnega organela. V genomu mikoplazme najdemo še dva za patogenezo pomembna gena. Eden je MPN159, ki kodira hemolizin, in drugi je MPN372, ki nosi zapis za CARDs toksin (angl. Community Acquired Respiratory Distress Syndrome) (Himmelreich in sod., 1996; Wodke in sod., 2015).

Raziskovalci so opazili, da se genomi bakterije *M. pneumoniae* razlikujejo med seboj. Glede na razlike v nukleotidnem zaporedju dveh ponavljajočih se regij genov so jih razdelili na dva tipa, v tip 1 in v tip 2. Pri obeh tipih se lahko pojavijo manjše sekvenčne razlike. Prvi sekvenciran genom bakterije *M. pneumoniae* pripada sevu M129, zato je ta sev postal prototip za tip 1. Sev *M. pneumoniae* FH je prototip tipa 2 (Catrein in sod., 2004).

Raziskovalci so ob dveh glavnih tipih (1 in 2) poročali še o eni različici tipa 1 (varianta 1) in dveh različicah tipa 2 (2a in 2b). Razlike v nukleotidnem zaporedju so prisotne v elementih RepMP2/3 in RepMP4 gena MPN141, ki kodira sintezo adhezina P1 (Dorigo-Zetsma in sod., 2001a; Dumke in sod., 2006; Kenri in sod., 1999). Sekvenci *M. pneumoniae* tipa 1 in tipa 2 se razlikujeta v polimorfizmu posameznega nukleotida (angl. single nucleotide polymorphism, SNP) v genu MPN141 in v genu MPN528a. V genu MPN141, ki nosi zapis za protein P1 je na mestu 184 991 prisoten timin, če je tip 1, ali citozin, če je tip 2. V genu MPN528a, ki kodira rekombinacijski encim DNA, ima tip 1 na mestu 650 584 adenin, tip 2 pa citozin (Spuesens in sod., 2010). Pojavnost intragenomskeih rekombinacij elementov RepMP2/3 je v bakteriji *M. pneumoniae* pogosta. Elementi RepMP2/3 se lahko rekombinirajo nerecipročno in enosmerno tudi izven gena MPN141. Razlike v sekvenkah, ki so vodile do poimenovanj novih različic (variant 1, 2a in 2b) so posledica rekombinacij znotraj elementov RepMP (Spuesens in sod., 2009).

Genetsko in evolucijsko lahko bakterije *M. pneumoniae* tako razdelimo v dva tipa, tip 1 in tip 2. Vsi elementi RepMP2/3 in RepMP4 imajo nukleotidno zaporedje značilno za ali tip 1 ali tip 2, kar kaže na različni evolucijski liniji razvoja. Analiza filogenetskih dreves ustvarjenih s sekvencami za RepMP2/3 in RepMP4 potrjuje to delitev. Sekvence RepMP so si sicer zelo podobne, a niso identične, zato je izključeno, da bi rekombinacija med genom

P1 in sekvencami RepMP povzročila veliko raznolikost genskih in antigenskih različic gena P1. V tej rekombinaciji lahko obstaja mehanizem, ki omogoča bakteriji izogibanje imunskemu sistemu gostitelja (Spuesens in sod., 2009, 2010).

2.6.1 Gen MPN141

Bakterija ima na površini več membranskih proteinov, ki imajo visoko afiniteto za specifične receptorje gostiteljskih celic. Eden teh proteinov je adhezin P1, ki ga kodira gen MPN141 (Razin, 1996).

Adhezin P1 je 170 kDa velik integralni membranski protein, ki je odgovoren za interakcije *M. pneumoniae* z gostiteljskimi celicami. Čeprav je skoncentriran na predelu za pritrjevanje, so manjše koncentracije prisotne po celotni površini celice. Kadar pride do spontane mutacije gena ali zdravljenja s tripsinom, lahko celice izgubijo P1 in s tem se izgubi njihova zmožnost pritrjevanja na evkariotske celice ter tudi njihova virulentnost (Balish in Krause, 2002; Waites in Talkington, 2004; Blanchard in Bébáar, 2002).

Gen MPN141, ki kodira adhezin P1, se v genomu bakterije *M. pneumoniae* M129 nahaja med 180 858. in 185 741. baznim parom (Himmelreich in sod., 1996). Gen vsebuje tipsko specifičen nukleotid v ohranjeni regiji blizu 3' konca gena na mestu 184 991 v sekvenci genoma *M. pneumoniae* M129 (Spuesens in sod., 2010).

Gen MPN141 je drugi od treh genov s skupnim promotorjem. Prvi je MPN140, poznan tudi kot ORF4, ki po predvidevanjih kodira fosfoesterazo. Sledi mu gen MPN141, nato pa gen MPN142, poznan tudi kot ORF6, ki kodira dva membranska polipeptida ob pritrjevalnem organelu znana kot protein B (P90) in protein C (P40). Gena MPN141 in MPN142 sta transkripcijsko in translacijsko povezana, zato so tudi proteini P1, B in C funkcionalno tesno povezani (Waldo in Krause, 2006). Znotraj gena MPN141 sta dva elementa RepMP imenovana RepMP2/3 in RepMP4, ki sta v celotnem genomu prisotna v 10 in 8 kopijah (Himmelreich in sod., 1996). Element RepMP2/3 je na 3' koncu gena in RepMP4 je lociran na 5' koncu gena (Ruland in sod., 1990). Ponavljanjoči se elementi RepMP se v velikosti razlikujejo. Element RepMP2/3 je dolg 1,5 – 1,8 kbp, RepMP4 pa 1,5 – 2 kbp (Catrein in sod., 2004). Med ponavljanjočimi se elementi genoma lahko prihaja do rekombinacij, kar vodi k raznolikost gena P1 in posledično k različnim tipom bakterije *M. pneumoniae* (Kenri in sod., 1999).

2.6.2 Gen MPN528a

Gen MPN528a se v genomu bakterije *M. pneumoniae* M129 nahaja med 650402. in 650920. baznim parom (Himmelreich in sod., 1996) in vsebuje tipsko specifičen nukleotid v genu MPN528a na mestu 650 584 genoma *M. pneumoniae* M129 (Spuesens in sod., 2010).

Gen MPN528a, ki nosi zapis za encim, ki je homologen rekombinacijskemu encimu RecU bakterije *Mycoplasma genitalium*, se nahaja v bakteriji *M. pneumoniae* v dveh različicah. Nukleotidno zaporedje gena MPN528a iz seva M129 vsebuje translacijski terminalni kodon TAA na mestu 181-183 in posledično gen ne kodira celotnega RecU, temveč le 60 aminokislin na N-terminalnem koncu. Sevi *M. pneumoniae* tipa 2, ki vsebujejo translacijski terminalni kodon TAC, pa kodirajo celoten encim RecU. Posledično lahko sklepamo, da le tip 2 izraža funkcionalen encim RecU. Raziskave *in vitro* so sicer pokazale njegovo inaktivnost (Sluijter in sod., 2010; Wodke in sod., 2015).

2.7 VIRULENTNI DEJAVNIKI BAKTERIJE *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

Genom bakterije *M. pneumoniae* zaradi parazitskega življenja nosi tudi zapis za virulentne dejavnike. Virulentni mehanizmi, kot so gibljivost bakterije, sposobnost tvorbe biofilma ali fakultativno intracelularno prodiranje, so prisotni v številnih patogenih vrstah mikoplazem. Precej vrst ima tudi sistem spreminjanja površinskih antigenov, ki so pomembni za izogibanje gostiteljevemu pridobljenemu imunskemu odzivu. Veliko vrst lahko z mikoplazemskimi komponentami zavre ali prekomerno stimulira imunske celice in njihove receptorje ter citokine. Bakterija *M. pneumoniae* je zmožna tvoriti biofilm, ki jo zaščiti pred imunskim odzivom. Tvorba biofilma pa je odvisna tudi od tipa *M. pneumoniae*, saj tip 1 tvori manj robustne biofilme, ki so na robovih bolj grobi, kot biofilmi bakterije tipa 2. Razlika v kvaliteti biofilma pa lahko vpliva na odpornost bakterije na imunski odziv gostitelja in zdravljenje z antibiotiki (Razin in Herrmann, 2002; Simmons in Dybvig, 2007; Simmons in sod., 2013).

Bakterija *M. pneumoniae* je odvisna od bližine gostiteljske celice na katero se veže s specializirano strukturo za pritrjevanje. Pritrjevalni organel je koničasta struktura na polu celice s centralnim filamentom obdanim s praznim prostorom, ki ga ovija celična membrana. Končasto strukturo sestavljajo glavni adhezin P1, interaktivne beljakovine in pomožne adhezivne beljakovine. Adhezini in druge koadhezinske beljakovine, ekstracelularni polisaharidi, endopeptidaze ter membranski lipoproteini, ki delujejo kot s patogeni povezani molekularni vzorci (angl. Pathogen-associated molecular pattern, PAMP), so virulentni dejavniki bakterije, ki izzovejo imunski odziv gostitelja. Epitopi površinskih adhezinov bakterije se razlikujejo od visoko ohranjenih domen, ki posredujejo adherenco. Vzrok za zmanjšan imunski odziv na ponovno okužbo je lahko nezmožnost imunskega sistema ustvariti protitelesa proti tem variabilnim domenam, ki bi lahko preprečila citoadherenco. Antigenske variante površinskih adhezinov, predvsem beljakovine P1, so posledica preoblikovanj DNA s kopijami gena za adhezin P1. Rekombinacija med temi ponavljaljajočimi se elementi in znotraj regij operona adhezina P1 omogočajo raznolikost in spremenjene specifikacije in afinitete antigenov (Shimizu in sod., 2014; Chourasia in sod., 2014; Waites in Talkington, 2004; Waites in sod., 2008).

Pomembni virulentni dejavniki, ki jih proizvajajo bakterije *M. pneumoniae* so topni hemolizin, vodikov peroksid in superoksidni radikali, ki povzročijo oksidativni stres v epiteliju dihal, saj inhibirajo katalazo in zmanjšajo encimsko razgradnjo peroksidov (Razin in Herrmann, 2002; Saraya in sod., 2014; Waites in sod., 2008).

Trije lipoproteini *M. pneumoniae* – MALP-2, P48 in M161Ag - spreminjajo imunski odziv gostitelja s signaliziranjem preko Toll-u podobnih receptorjev (TLR-2/TLR-6). Preko slednjih tudi lipoproteini N-ALP1/N-ALP2 aktivirajo proteinski kompleks, ki upravlja prepis DNA. Stimulacija teh TLR je povezana s produkcijo kemokinov, ki spodbujajo promet limfocitov in nevtrofilcev v pljuča (Saraya in sod., 2014).

Novejše raziskave kažejo, da so lahko toksini virulentni dejavnik bakterije *M. pneumoniae*. Posebnost bakterije *M. pneumoniae* je citotoksin CARDs, ki povzroča ADP ribozilacijo in vakuolacijo v gostiteljskih celicah. Beljakovina, ki ima sekvenco homologno sekvenci za podenoto S1 pertusis toksina se specifično veže na surfaktantno beljakovino A. Zveza teh dveh proteinov povzroča nastanek vakuol in preprečuje gibanje mitotalk gostiteljskih celic, kar kaže na možnost, da takšen encimski kompleks deluje kot eksotoksin med okužbo z mikoplazmo. Poskusi na miškah so pokazali, da inokulacija tega toksina v miš povzroči povečanje sproščanja interlevkinov IL-1 α , 1 β , 6, 12, 17, tumor nekrozirajočega faktorja (angl. tumor necrosis factor, TNF) α in interferona γ (Atkinson in sod., 2008; Saraya in sod., 2014).

Kljub temu, da je bakterija zunajcelični parazit, so raziskave *in vitro* pokazale tudi njen sposobnost prodiranja in vstopanja v celice. Mikoplazme lahko vstopijo v celice v dveh urah in ostanejo intracelularne tudi več kot 7 ur. Interakcije med bakterijami in epitelnimi celicami sprožijo signalne poti, ki se kažejo v delovanju citoskeletalnih proteinov kot sta tubulin in aktin (Sánchez-Vargas in Gómez-Duarte, 2008). Kako se bakterija *M. pneumoniae* dejansko prebije v notranjost celic *in vivo* še ni poznano. Obstoj bakterije znotraj celic bi pojasnil razvoj latentnih in kroničnih stanj, mehanizme izogibanja imunkemu sistemu, zmožnost bakterije, da prečka sluznično bariero in dobi dostop do notranjih organov in zmanjšano učinkovitost zdravljenja citokinov (Waites in Talkington, 2004).

Združitev mikoplazemske celične membrane z gostiteljevo lahko sproži sprostitev hidrolitičnih encimov, ki jih sintetizira mikoplazma, in tudi vstavitev komponent mikoplazemske membrane v celično membrano gostitelja, kar lahko spremeni prepoznavna mesta receptorjev in vpliva na izražanje citokinov (Waites in Talkington, 2004; Waites in sod., 2008).

Bakterija se poslužuje tudi molekularne mimikrije. Dokazano je, da lahko pride do navzkrižne reakcije med monoklonskimi protitelesi, ki inhibirajo vezavo adhezina P1, z intracelularnimi antigeni evkarionskih celic (Atkinson in sod., 2008). Velika podobnost

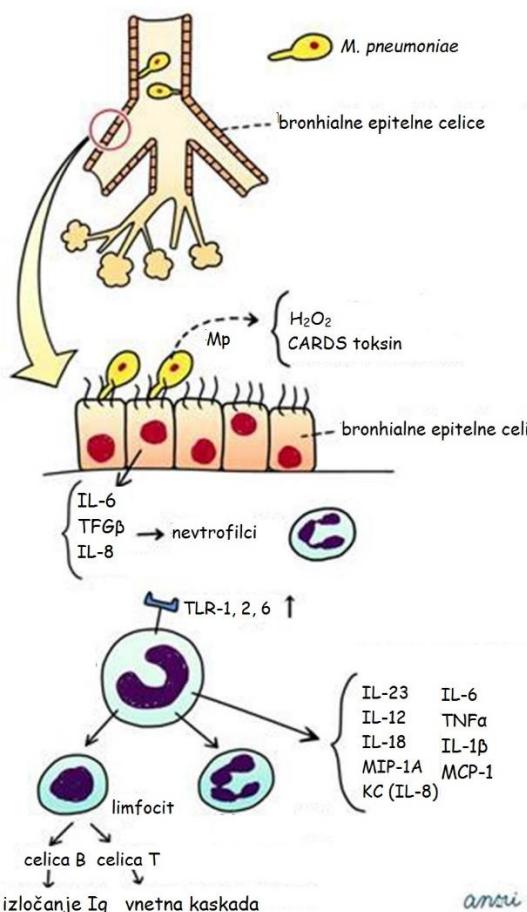
sekvenč adhezinskih proteinov in glikolipidov celične membrane bakterije s sekvencami beljakovin celic sesalcev lahko sproži avtoimunske bolezni, saj ob okužbi z bakterijo nastajajo protitelesa tudi proti miozinu, keratinu, fibrinogenu, ledvicam, jetrom, gladkim mišicam in pljučnem tkivu. Mikoplazemski adhezini imajo tudi podobno zaporedje amino kislin kot humani limfociti CD4, antigen I na eritrocitih, antigeni poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa razreda II. (Waites in Talkington, 2004; Atkinson in sod., 2008).

2.8 PATOGENEZA

Bakterija *M. pneumoniae* se veže na receptorje epitelijskih celic dihal. Sledi kolonizacija dihal in okužba, ki vodi v poškodbo pljučnega tkiva (Waites, 2003; Sánchez-Vargas in Gómez-Duarte, 2008).

Ko pridejo bakterije v dihala, se s pritrjevalnim organelom, na katerem so adhezin P1 in druge pritrjevalne beljakovine, vežejo na migetalčne celice epitelija dihal. Zaradi odsotnosti celične stene so lahko mikoplazme v tesnem kontaktu z gostiteljevimi celicami, kar omogoča izmenjavo snovi potrebnih za rast in razmnoževanje. Pritrditev na celice tudi zaščiti mikoplazmo pred odstranitvijo iz dihal, ki sicer poteka z izločanjem sluzi in gibanjem migetalk. Vezava bakterije *M. pneumoniae* na epitelijske celice sproži preko TLR-4 vnetni odziv in autofagocitozo, čeprav mikoplazme nimajo celične stene in posledično tudi ne lipopolisaharidov, ki so ligandi za TLR-4 (Waites in Talkington, 2004; Shimizu in sod., 2014). *M. pneumoniae* neposredno aktivira in inducira produkcijo citokinov iz levkocitov v krvi, epitelnih celic dihal in makrofagov. Ob okužbi z *M. pneumoniae* se sproščajo TNF- α , IL-8 in IL-1 β , kar kaže na pomembnost citoadherence mikoplazme pri nastajanju imunskega odgovora (sl. 4) (Waites in sod., 2008).

Ni še popolnoma znano kako bakterija poškoduje epitelne celice dihal po vezavi nanje. Vemo, da bakterija *M. pneumoniae* sintetizira vodikov peroksid in superoksidne radikale, ki sodelujejo s toksičnimi kisikovimi molekulami, ki jih proizvajajo gostiteljeve celice. Vpliv peroksidu na gostiteljeve celice, npr. na eritrocite, se kaže v denaturaciji hemoglobina, oksidaciji lipidov in lizi celice. Superoksidni ion lahko tudi inhibira katalazo gostiteljeve celice, kar zmanjša encimski razkroj peroksidu in naredi celico bolj dovetno za oksidativne poškodbe. Pridobitev laktoferina iz gostiteljskih celic lahko ravno tako povzroča poškodbe celic, saj se v okolico sprostijo železovi kompleksi, ki sprožijo nastanek vodikovih radikalov. Bakterija sintetizira tudi toksin CARDs, ki se veže na beljakovino A in vstopi v gostiteljeve celice z endocitozo posredovano s klatrinom. Toksin nato povzroči cilostazo in fragmentacijo jedra ter stimulira proizvodnjo vnetnih citokinov. Vstop same bakterije v celico pa omogoča zaščito bakterije pred protitelesi in antibiotiki, hkrati pa pripomore k vzpostavitvi dolgotrajne okužbe (Waites in Talkington, 2004; Atkinson in Waites, 2014; Saraya in sod., 2014).



Slika 4: Interakcije med bakterijo *Mycoplasma pneumoniae* (Mp) in gostiteljevimi celicami (Saraya in sod., 2014)

Ob delovanju virulentnih dejavnikov epitelne celice dihal običajno izgubijo mitotelke, poveča se število vakuol v celicah in opaziti je zmanjšano porabo kisika, uporabo glukoze, sinteza aminokislin in makromolekul se zmanjša, kar se konča s propadom celic (Waites in sod., 2008).

2.8.1 Imunski odziv gostitelja

Tako po prirreditvi bakterije na površino epitelnih celic se aktivirajo makrofagi, vključno z alveolarnimi makrofagi, ki so začetni obrambni mehanizem gostitelja. Nastopi kemotaksično gibanje makrofagov in nevtrofilcev proti mestu okužbe. Število nevtrofilcev in limfocitov se poveča. Limfociti T CD4, limfociti B in plazmocite pridejo v pljuča, kar radiološko opazimo kot pljučne infiltrate. Bakterija *M. pneumoniae* neposredno aktivira celice imunskega sistema, da začno proizvajat citokine. Alveolarni makrofagi sproščajo vnetne citokine, TNF- α , MIP-1 α , KC in MCP-1, ki so povezani z vstopom nevtrofilcev v pljuča. Ob začetku imunskega odziva se začne tudi pomnoževanje limfocitov, produkcija imunoglobulinov, sproščanje gama interferona γ -IFN in različnih interlevkinov (IL-1, IL-5, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 in IL-18). Aktivacija proizvodnje citokinov je odvisna od

ostankov sialične kisline na tarčnih celicah in adhezina P1. Pri aktivaciji celičnega vnetnega odziva je pomembno tudi signaliziranje s TLR-1, 2, 6, ki prepozna mikoplazmo (Waites in Talkington, 2004; Saraya in sod., 2014; Atkinson in Waites, 2014).

Bakterija *M. pneumoniae* spodbuja tudi limfocite B in T in sproža nastajanje protiteles, ki reagirajo z različnimi tkivi gostitelja. Imunski odziv povzroči tvorbo protiteles za mnoge imunogene beljakovine in lipide mikoplazme. En teden po okužbi lahko dokažemo protitelesa IgM, ki dosežejo najvišjo koncentracijo v 3 do 6 tednih po okužbi. Producija protiteles IgG sledi dva tedna po začetku sinteze protiteles IgM. Mnogi klinični znaki okužbe so tako bolj posledica imunopatoloških in vnetnih odzivov gostitelja kot škodljivih vplivov bakterije (Atkinson in Waites, 2014).

Mikoplazme so lahko tudi mitogene za limfocite B in T, saj aktivirajo poliklonske limfocite B in limfocite T usmerjene proti samim sebi (Waites, 2003). Najbolj poznan primer bolezni zaradi avtoimunskega odziva na okužbo z bakterijo *M. pneumoniae* je nevrološka bolezen sindrom Guillain-Barré (Atkinson in sod., 2008).

2.9 BOLEZNI, KI JIH POVZROČA BAKTERIJA *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

Bakterija *M. pneumoniae* povzroča 2-18 % primerov zunajbolniških pljučnic v Sloveniji (Mušič in sod., 2010). Skrita pred imunskim sistemom povzroča zapoznel imunski odziv gostitelja. Šele en do tri tedne po okužbi se pojavi prvi klinični znaki, ki so večinoma nespecifični (Jacobs, 2002).

Bakterija *M. pneumoniae* se prenaša z aerosoli z osebe na osebo. Okužba se pogosto širi znotraj družine ali v tesnih, zaprtih skupnostih. Za uspešno kolonizacijo novega gostitelja je včasih potrebno več stikov z aerosoli okuženih oseb (Waites in Talkington, 2004). Tipična okužba dihal z bakterijo *M. pneumoniae* je počasi razvijajoča se bolezen z vnetjem žrela, vnetjem sinusov, občasno tudi z vnetjem srednjega ušesa, ki se nato razširi na spodnja dihalna v primarno atipično pljučnico z vročino od 38 do 39,5 °C. Inkubacijska doba je lahko do 3 tedne (Atkinson in sod., 2008). Pri odraslih je inkubacijska doba od 4 do 24 dni, pri otrocih je precej krajsa (2-12 dni) (Jacobs, 2002).

Klinični simptomi so precej raznoliki. Začne se lahko s suhim kašljem, ki se po 3 do 4 dneh razvije v produktiven kašelj. Pojavijo se lahko gripi podobni simptomi. Pri mnogih posameznikih se bolezen nikoli ne razvije do resnega obolenja spodnjih dihal (Atkinson in sod., 2008). Obolenja, kjer ne pride do zapletov, so pogosto razdeljena na dve fazi, kjer vročinska faza traja kakšen teden, kašelj in slabo počutje pa lahko ostaneta do dveh tednov in še dlje (Waites in Talkington, 2004). Pri otrocih mlajših od 5 let se lahko pojavi nahod in piskanje pred razvojem pljučnice, pri otrocih do 15 let pa je veliko bolj verjeten razvoj bronhialne pljučnice. Pri odraslih so običajne mile in asimptomatske okužbe. Dorigo-Zetsma in sod. (2001b) so opazovali kontakte znotraj družine pri pacientih pozitivnih na okužbo z

M. pneumoniae. Le 25 % oseb je obiskalo zdravnika, kar kaže na milo obliko bolezni. V družinah je bilo največ oseb pozitivnih na okužbo z bakterijo mlajših od 15 let. Te osebe so bile brez simptomov ali so imele milo obliko bolezni, ki ni zahtevala obiska zdravnika. Ti podatki vodijo k predvidevanju, da predvsem otroci služijo kot rezervoar bakterije.

Mycoplasma pneumoniae lahko povzroča zunajpljučne okužbe v 25 %, za večino katerih je odgovoren avtoimunski odziv. Zunajpljučni bolezenski znaki se lahko razvijejo pred razvojem pljučnice, med samim potekom pljučnice, kasneje ali celo brez sočasne okužbe dihal. Bakterija je lahko prisotna tako v krvi, sklepni tekočini, likvorju, kot v perikardiju in kožnih lezijah, kamor lahko zaide z neposredno invazijo (Waites in Talkington, 2004).

Zapleti v centralnem živčnem sistemu so najbolj pogosta zunajpljučna okužba z bakterijo *M. pneumoniae*. Večina bolnikov z nevrološkimi zapleti opazi te klinične znake en do dva tedna po začetku obolenja dihal (Waites in Talkington, 2004). Okužbo z bakterijo *M. pneumoniae* povezujejo tudi s povzročanjem astme (Atkinson in sod., 2008).

Mycoplasma pneumoniae lahko povzroči vnetje ustne sluznice in sindrom Stevens-Johnson. Bolečine v mišicah in sklepih ter bolezni sklepov se pojavijo pri 15 % okuženih z bakterijo in lahko trajajo dalj časa. Bakterija lahko pri ljudeh povzroča artritis, predvsem pri imunsko oslabljenih bolnikih z agamaglobulinemijo (Narita, 2010; Waites in Talkington, 2004).

Zapleti povezani s srcem in krvožiljem zaradi okužbe z *M. pneumoniae* so v Evropi redkeje opisani, a se lahko pojavijo pri 1-8,5 % okuženih, predvsem pri odraslih. V Aziji je bakterija *M. pneumoniae* povezana tudi s Kawasaki-vo boleznijo, ki nastane zaradi odziva imunskega sistema na okužbo. Redek, a resen zaplet je tudi hemolitična anemija, ki je pogostejša pri otrocih. Z okužbo z bakterijo *M. pneumoniae* so povezani tudi primeri vnetja glomerulov in odpoved ledvic (Waites in Talkington, 2004; Narita, 2010).

2.10 EPIDEMIOLOGIJA

M. pneumoniae se lahko prenaša z aerosoli z osebe na osebo. Še posebej učinkovito se mikroorganizem širi s kašljanjem okužene osebe. Pri okuženih osebah lahko mikoplazmo dokažemo v brisu nosne sluznice, grla, v izmečku in v sapnicah. Izbruhi okužb z *M. pneumoniae* se pogosteje pojavljajo v zaprtih in polzaprtih skupnostih kot so vojaške baze, zdravstvene ustanove, verske skupnosti in centri za oskrbo duševno in telesno prizadetih (Waites in Talkington, 2004).

V posameznih epidemijah lahko delež pljučnic povzročenih z bakterijo *M. pneumoniae* naraste tudi na 50 % vseh pljučnic. Obsežna študija v Seattlu je pokazala, da *M. pneumoniae* povzroča 15-20 % vseh zunajbolnišničnih pljučnic. Incidenca okužb je povezana tudi s starostjo. Stopnja endemičnih pljučnic povzročenih z bakterijo *M. pneumoniae* je najvišja pri otrocih starih od 5 do 9 let, sledi jim skupina otrok med 10. in 14. letom. Okužbe pri

odraslih so redkejše in so večinoma posledica tesnejših stikov znotraj družine. Bolj ogrožena skupina so nato starejši od 65 let, ki imajo običajno tudi oslabljen imunski sistem (Hammerschlag, 2001; Foy, 1993).

Presenetljiv vidik okužb z bakterijo *M. pneumoniae* je periodičnost epidemij. Lind s sod. je v Danski seroepidemiološki študiji (1997), ki je spremljala podatke več kot 50 let, pokazal skoraj reden vzorec epidemij vsake štiri leta in pol. Prav tako študije v Severni Ameriki in Evropi potrjujejo ta opažanja. Čeprav se incidenca okužb ne razlikuje veliko med letnimi časi, pa je opaziti večji delež pacientov s pljučnico povzročeno z *M. pneumoniae* poleti, saj je takrat nižja incidenca ostalih respiratornih patogenov (Jacobs, 2012; Waites in Talkington, 2004). Lind in sodelavci so sklepali, da se ohrani čredna imunost približno štiri leta, preden so ljudje spet dovetni za okužbe z bakterijo *M. pneumoniae*. Študije v Veliki Britaniji in na Danskem kažejo še eno značilnost epidemije okužb z bakterijo *M. pneumoniae*. Opazno je, da epidemija poteka dve leti z vmesnim znižanjem števila okužb v poletnih mesecih (Lind in sod., 1997; Jacobs, 2012).

Študije iz Nemčije in Japanske nakazujejo na različnost tipov adhezina P1, ki naj bi bila odgovorna za razvoj in periodičnost epidemij (Waites in Talkington, 2004). Po primerjavi genotipizacij bakterije *M. pneumoniae* so na Japonskem opazili, da na dve do tri leta pride do zamenjave tipa bakterije *M. pneumoniae*, ki najpogosteje povzroča okužbe, iz tipa 1 v tip 2 ali obratno. Ko en tip postane dominanten, se njegova prevlada ohrani približno 7 let. Nato so primerjali, ali se te zamenjave zgodijo v povezavi z epidemijami in opazili so možne korelacije. Do izbruha epidemije lahko pride zaradi antigenske spremembe patogena ali zaradi razširjanja dominantnega tipa v populaciji. Znano je, da pacienti, ki prebolijo okužbo z bakterijo *M. pneumoniae*, kažejo zmožnost inhibicije vezave bakterije na eritrocite. Ta inhibitorna aktivnost verjetno služi kot način imunosti, ki zmanjša možnost ponovne okužbe. Raziskave kažejo, da verjetno obstaja tipsko specifična zaščita pred bakterijo, ki je rezultat imunosti na določen tip adhezina P1 (Sasaki in sod., 1996; Kenri in sod., 2008).

2.10.1 Pojavnost epidemij v Evropi in po svetu

Podatki o epidemijah in deležu posameznega tipa skozi čas so zbrani vse od leta 1944 dalje. Čeprav v večini držav prijavljanje mikoplazemskih okužb ni obvezno, vseeno veliko inštitutov in raziskovalnih centrov zbira epidemiološke podatke. Slednje smo zbrali in uredili v dveh preglednicah, ki prikazujeta pojavnost epidemij okužb z bakterijo *M. pneumoniae* in opravljene raziskave in tipizacije v posameznih državah (pregl. 4 in pregl. 5).

Prvi tipizirani sevi bakterije *M. pneumoniae* so sevi bakterije, ki so jih raziskovalci zbrali z različnih geografskih področij ZDA med letoma 1944 in 1988. Rezultati so pokazali 86,21 % prevlado tipa 2 bakterije *M. pneumoniae* med 29 vzorci (Su in sod., 1990). V 70. in 80. letih prejšnjega stoletja je bila večina izoliranih sevov v ZDA bakterije *M. pneumoniae* tip 1 (Ursi in sod., 1994).

Najzgodnejše poročilo o izbruhu epidemije v Evropi sega v leto 1958 na Danskem (Lind in sod., 1997). Večina sevov izoliranih na Danskem med letoma 1962 in 1986 pripada bakterijam *M. pneumoniae* tipa 1 (Cousin-Allery in sod., 2000). Skoraj vsi izolirani sevi na Danskem in v Franciji med letoma 1987 in 1988 so bakterije *M. pneumoniae* tip 2. Nato pa se tipa ponovno zamenjata in bakterija tipa 1 prevladuje do leta 1994 tako na Danskem, v Franciji kot v Nemčiji in Belgiji (Cousin-Allery in sod., 2000; Ursi in sod., 1994). Raziskave v Franciji med letoma 1994 in 2006 kažejo, da so do 1995 vsi sevi pripadali bakterijam *M. pneumoniae* tip 1. Nato se je prisotnost tipa 2 povečevala. Od 1998 sta oba tipa v enakem razmerju (Pereyre in sod., 2007).

Sasaki in sodelavci (1996) so v obsežni študiji med letoma 1976 in 1996 ugotovili, da so na Japonskem najprej prevladovale okužbe s tipom 1 bakterije *M. pneumoniae*, medtem ko so konec 70. let prevladale okužbe s tipom 2. Leta 1985 je narastel delež tipa 1 in se ohranil kot prevladujoči tip vse do leta 1992. Na Japonskem je izbruhnila epidemija leta 1984, ko je tudi prišlo do zamenjave prevladujočega tipa bakterije *M. pneumoniae* (Kenri in sod., 1999). Leta 1992 so se na Japonskem razširile bakterije *M. pneumoniae* tip 2, ki so leto kasneje dosegle prevlado in jo ohranile vse do leta 2001, ko se je ponovno razširil tip 1 bakterije *M. pneumoniae*, ki je nato prevladoval do leta 2005 (Sasaki in sod., 1996; Kenri in sod., 2008.)

Več poročil o epidemijah je v začetku novega tisočletja. Prva epidemija je bila leta 2000 na Norveškem, sledila je epidemija na Finskem med letoma 2000 in 2002, nato pa so se med letoma 2005 in 2007 pojavile epidemije na Norveškem in Švedskem, v Angliji in Walesu, v Franciji, Izraelu, na Finskem in na Danskem (Blystad in sod., 2012; Linde in sod., 2012; Chalker in sod., 2012; Eibach in sod., 2012; Nir-Paz in sod., 2012; Polkowska in sod., 2012; Rasmussen in sod., 2010).

Dumke in sod. (2006) so analizirali seve *M. pneumoniae* pridobljene v Nemčiji in Švici med letoma 2003 in 2005, kjer je večinski delež pripadal bakteriji tipa 2. Martínez in sod. (2010) so med letoma 2005 in 2006 v Čilu pokazali prevlado tipa 2. Zhao in sod. (2011) pa so analizirali seve *M. pneumoniae* pridobljene v Pekingu med letoma 2008 in 2009. Od 60 sevov je bilo kar 86,7 % sevov bakterije *M. pneumoniae* tip 1 (Zhao in sod., 2011).

V ZDA so tipizirali vzorce zbrane med letoma 2006 in 2013. Pokazala se je rahla prevlada bakterij *M. pneumoniae* tip 1 vse do leta 2013, ko se je izenačil s tipom 2 (Diaz in sod., 2015).

Podatkih, ki jih je zbral Langlet s sod. (2012), kažejo na epidemijo okužb z bakterijo *M. pneumoniae* v več državah Evropske unije med letoma 2010 in 2012. Povečano število okužb so opazili predvsem v državah severne Evrope (Danska, Finska, Nizozemska in Norveška) in v Veliki Britaniji (Langlet in sod., 2012).

Vse zbrane podatke o epidemijah okužb z bakterijo *M. pneumoniae* smo prikazali v preglednici 4, preglednica 5 pa vsebuje iz literature zbrane podatke o epidemioloških študijah in genotipizacijah bakterije *M. pneumoniae*.

Preglednica 4: Zbrani podatki o epidemijah okužb z bakterijo *Mycoplasma pneumoniae* v Evropi in na Japonskem

Država	Leto epidemije	Vir
Danska	1949/50, 1958, 1962/64, 1967/68, 1971/73, 1977/79, 1987/88, 1991/92, 1998/99, 2004/06, 2010/11	Lind in sod., 1997, Uldum in sod., 2012, Rasmussen in sod., 2010
Nemčija	2011/12	Jacobs in sod., 2015
Norveška	1987, 1993, 2000, 2006, 2011/12	Blystad in sod., 2012
Švedska	2010/11	Linde in sod., 2012
Anglija, Wales	2005/06, 2011	Chalker in sod., 2012
Francija	2005/06, 2009/11	Eibach in sod., 2012
Finska	2004/6, 2011	Polkowska in sod., 2012
Škotska	2010/11	Gadsby in sod., 2012
Japonska	1984, 1988, 1992, 1996, 2006	Sasaki in sod., 1996, Kenri in sod., 2008

Preglednica 5: Zbrani podatki opravljenih epidemioloških študij o pojavnosti in prevladujočem tipu bakterije *Mycoplasma pneumoniae* v zadnjih 70 letih

Država/mesto	Leto	Število testiranih	Prevladujoč tip	Vir
Belgija	1988–1994	24	Tip 1 (79,2 %)	Ursi in sod., 1994
Čile	2005–2006	23	Tip 2 (78,3 %)	Martinez in sod., 2010
Danska	1962–1986	44	Tip 1 (84,1 %)	Cousin-Allery in sod., 2000 Lind in sod., 1997 Uldum in sod., 2012 Rasmussen in sod., 2010
	1987–1990	27	Tip 2 (70,4 %)	
	1991–1994	32	Tip 1 (78,1 %)	
Francija	1977–1986	9	Tip 1 (55,6 %)	Cousin-Allery in sod., 2000 Pereyre in sod., 2007 Pereyre in sod., 2012 Eibach in sod., 2012
	1987–1990	15	Tip 2 (93,3 %)	
	1991–1998	85	Tip 1 (88,6 %)	
	1999–2002	50	Tip 2 (60,0 %)	
	2003	6	Enakovredna	
	2004	15	Tip 2 (66,7 %)	
	2005	12	Enakovredna	
	2006	8	Tip 1 (62,5 %)	
	2007–2010	34	Enakovredna	
Italija	2010	40	Tip 2 (82,5 %)	Chironna in sod., 2011
Izrael	2010	63	Enakovredna	Pereyre in sod., 2012 Nir-Paz in sod., 2012

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 5: Zbrani podatki opravljenih epidemioloških študij o pojavnosti in prevladujočem tipu bakterije *Mycoplasma pneumoniae* v zadnjih 70 letih

Država/mesto	Leto	Število testiranih	Prevladujoč tip	Vir
Japonska	1976	4	Tip 1 (75 %)	Sasaki in sod., 1996 Kenri in sod., 2008
	1979–1980	24	Tip 2 (100 %)	
	1983		Enakovredna	
	1984	20	Tip 2 (65 %)	
	1985–1992	106	Tip 1 (87,7 %)	
	1993–2002	141	Tip 2 (77,5 %)	
	2003–2005	99	Tip 1 (75,0 %)	
Nemčija	1989	1	Tip 2 (100 %)	Dumke in sod., 2006 Dumke in sod., 2015 Jacobs in sod., 2015
	1990	1	Tip 1 (100 %)	
	1991	4	Tip 2 (100 %)	
	1992–1997	62	Tip 1 (92,0 %)	
	1998	13	Tip 2 (76,9 %)	
	1999	11	Tip 1 (90,9 %)	
	2003–2005	73	Tip 2 (54,63 %)	
	2011–2012	96	Tip 1 (60,4 %)	
Peking	2008–2010	95	Tip 1 (91,9 %)	Zhao in sod., 2011, Tian in sod., 2010
Sydney	2008–2012	30	Enakovredna	Xue in sod., 2014
Šanghaj	2009–2011	109	Tip 1 (92,7 %)	Xiao in sod., 2014
Švica	2004–2005	35	Tip 2 (54,63 %)	Dumke in sod., 2006
ZDA	1944–1988	29	Tip 2 (86,21 %)	Su in sod., 1990 Diaz in sod., 2015
	2006–2010	20	Tip 1 (65–100 %)	
	2011	31	Enakovredna	
	2012–2013	88	Tip 1 (65 %)	

2.11 ZDRAVLJENJE OKUŽB Z BAKTERIJO *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

Mikoplazme so brez celične stene zato so naravno odporne proti beta-laktamom in drugim protimikrobnim učinkovinam, kot so glikopeptidi in fosfomicin, ki delujejo na celično steno (Bébéar C. M. in Bébéar C., 2002). Zaradi odsotnosti lipopolisaharidov in celične stene ter nezmožnosti sinteze lastnih nukleotidov so mikoplazme odporne tudi na polimiksine, vankomicin, sulfonamide in trimetoprim. Prav tako so odporne na rifampin, ki ne deluje na njihovo RNA polimerazo (Bebear in Kempf, 2005).

Mikoplazemske okužbe zdravimo z antibiotiki, ki inhibirajo sintezo proteinov ali podvojevanje DNA, kot so makrolidi in ketolidi. Fluorokinoloni in aminoglikozidi niso široko uporabljeni za zdravljenje mikoplazemskih okužb. Bakterija *M. pneumoniae* je občutljiva na makrolide, linkozamide in streptogramin ter na ketolide, nov razred

antibiotikov (Kenny in Cartwright, 2001). Makrolidi, linkozamidi in streptogramini se vežejo na 23S rRNA v domeni II in V in vplivajo na peptidiltransferazno aktivnost (Lucier in sod., 1995; Bébéar in sod., 2011). Tetraciklini se pri mikoplazmah vežejo na podenoto 30S ribosomov in delujejo bakteriostatično (Bébéar in sod., 2011).

Nekatere vrste mikoplazem so razvile odpornost proti antibiotikom in so odporne proti eritromicinu in azitromicinu, kar je posledica mutacije v 23S rRNA (Pereyre in sod., 2002). Odpornosti proti fluorokinolonom so lahko posledica mutacij v genih *gyrA*, *gyrB*, *parC* in *parE*, ki so pomembni za podvojevanje DNA, ali delovanja mehanizma aktivnega izločanja antibiotika ter nezmožnosti vstopa antibiotika v celico (Hopper, 2000).

2.12 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA

Kužnine, ki so primerne za dokazovanje okužbe z bakterijo *M. pneumoniae*, so izmeček, brisi nazofarinks in žrela, aspirati nazofarinks in sapnic, bronhoalveolarni izpirek, vzorec pleuralne tekočine. Kužnine morajo biti prenesene v laboratorij v najkrajšem možnem času in shranjene pri 4 °C (Loens in sod., 2003). Ob sumu na okužbo z bakterijo *M. pneumoniae* lahko bolnikom odvzamemo kri za dokaz protiteles.

2.12.1 Neposredne metode dokazovanja okužb z bakterijo *Mycoplasma pneumoniae*

2.12.1.1 Metode osamitve bakterije *Mycoplasma pneumoniae*

Mikoplazme so posebej težavne za kultivacijo v tekočih in na trdnih gojiščih. V primerjavi z molekularnimi tehnikami je občutljivost gojivnih metod za bakterijo *M. pneumoniae* največ 60 %, medtem ko je specifičnost 100 % (Waites in Talkington, 2004; Razin, 2002). Tully in sod. (1979) so razvili gojišče SP4, ki je najuspešnejše in široko uporabno gojišče za kultivacijo bakterije *M. pneumoniae*. Dokazovanje *M. pneumoniae* v kulturi temelji na njeni hidrolizi glukoze. Po inkubaciji 4 dni ali več v tekočem gojišču z dodanim pH indikatorjem fenol rdeče, gojišče spremeni barvo iz rjave v zeleno. Bakterijo *M. pneumoniae* lahko gojimo tudi na trdnem PPLO selektivnem gojišču, kjer tvori sferične kolonije velike do 100 mm v premeru v obliki jajca na oko, ki so vidne pod stereomikroskopom (Atkinson in sod., 2008; Tully in sod., 1979). Tekoče gojišče lahko inkubiramo aerobno pri 37 °C, trdna gojišča pa mikraerofilno s 5 % CO₂ (Waites in Talkington, 2004).

2.12.1.2 Metoda PCR

Razvoj molekularnih metod kot je reakcija PCR je zmanjšal pomen kultivacijskih metod za dokazovanje okužb z bakterijo *M. pneumoniae* (Waites in Talkington, 2004). Pri reakciji PCR lahko uporabljam oligonukleotidne začetnike za ATPazni gen bakterije *M. pneumoniae*. Uporabljam tudi druga tarčna nukleotidna zaporedja, predvsem gen za adhezin P1 in ohranjene regije v 16S rRNA, gen *tuf* in ponavlajoči se element RepMP1 (Waites in Talkington, 2004).

Reakcija PCR omogoča zgodnje odkrivanje okužbe, rezultate dobimo v manj kot enem dnevu in z njim dokažemo mikoplazme tudi v tkivu, ki je že bilo histološko pregledano (Talkington in sod., 1998). Prednost reakcije PCR pa je tudi v visoki občutljivosti in specifičnosti testa (Daxboeck in sod., 2002). V testu mora biti vključena interna kontrola, s katero ugotavljamo navzočnost inhibitorjev. Trenutno sicer obstajajo tudi reagenti za čiščenje nukleinskih kislin, ki odstranijo večino zaviralnih snovi (Waites in Talkington, 2004).

2.12.2 Posredne metode dokazovanja okužb z bakterijo *Mycoplasma pneumoniae*

2.12.2.1 Serologija

V današnjem času je dostopnost mnogih komercialnih seroloških testov, ki temeljijo na dokazovanju specifičnih protiteles, olajšala diagnostiko mikoplazemski okužb. Občutljivost seroloških testov je odvisna od časa odvzema krvi. Bolnikom odvzamemo kri ob nastopu bolezni in naslednji, parni vzorec krvi, po dveh do štirih tednih. Z encimsko imunskim testom ELISA (angl. enzyme linked immunosorbent assays, ELISA) dokazujemo protitelesa IgG, IgA in IgM. Okužbo z bakterijo *M. pneumoniae* potrdimo z dokazom protiteles IgM ali s 4-kratnim povečanjem titra protiteles IgG (Qu in sod., 2013a).

Protitelesa IgM nastanejo 7 do 10 dni po okužbi, torej 2 tedna pred protitelesi IgG, zato se uporabljam za zgodnje odkrivanje okužb, še posebej pri otrocih. Vendar pri novorojenčkih, mlajših od 6 mesecev, in pri odraslih pogosto ne nastajajo, še posebej, če je prišlo do ponovne okužbe. Ravno tako protitelesa IgM pri odraslih ne kažejo vedno akutne okužbe, saj lahko ostanejo v telesu do enega leta (Loens in sod., 2010; Waites in sod., 2012; Talkington in sod., 2004). Bakterija *M. pneumoniae* je patogen, ki naseljuje sluznice, zato protitelesa IgA nastanejo hitro po okužbi, posebej pri starejših bolnikih, njihovo število pa upade prej kot število protiteles IgM in IgG, zato so boljši pokazatelj akutnih okužb (Waites in Talkington, 2004).

2.13 TIPIZACIJA BAKTERIJE *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

Bakterijo *M. pneumoniae* lahko glede na gen P1 tipiziramo z različnimi metodami.

Metoda prenosa po Southernu omogoča dokazovanje izbrane sekvence DNA. DNA z encimi fragmentiramo, slednje pa ločimo z elektroforezo. Ločene fragmente DNA nato prenesemo na najlonsko ali nitrocelulozno membrano in jih ločimo po velikosti. Pri bakteriji *M. pneumoniae* so Su in sod. (1990) analizirali gen P1, ki so ga razrezali z različnimi encimi. Ugotovili so, da so sekvence posameznih tipov različne, saj so po razrezu dobili različno dolge fragmente, značilne za posamezen tip.

Pri tipizaciji z metodo RFLP (angl. restriction fragment length polymorphism – polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov) uporabljamo dva para začetnih oligonukleotidov in sicer se za RepMP4 uporablja začetne oligonukleotide ADH1 in ADH2, med tem ko za RepMP2/3 začetne oligonukleotide ADH3 in ADH4. Restrikcijske fragmente ločimo z gelsko elektroforezo z denaturirajočim gradientom (DGGE) ali z elektroforezo v pulzirajočem polju (PFGE) (Xiao in sod., 2014; Cousin-Allery in sod., 2000; Kenri in sod., 1994). Tip 1 lahko od tipa 2 ločimo tudi z analizo talilne krivulje visoke ločljivosti, saj ima DNA bakterije tipa 1 višjo temperaturo tališča (Schwartz in sod., 2009).

Bakterijo *M. pneumoniae* lahko tipiziramo z multilokusno analizo spremenljivega števila tandemskih ponovitev (MLVA; angl. Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis) s katero dobimo fragmente različnih lokusov v genomu. Na podlagi kombinacij fragmentov razvrstimo bakterijo v enega od tipov MLVA v referenčnih zbirkah podatkov (Dumke in sod., 2006).

Pri izvedbi testa MLVA moramo z reakcijo PCR pomnožiti izbrane lokuse v genomu. Pomnožke reakcije nato nanesemo na gelsko elektroforezo, kjer jim določimo dolžine glede na referenčni DNA fragment. Glede na dolžino lokusov dobimo število ponovljivih zaporedij v lokusu. Informacijo, ki jo tako dobimo, primerjamo v bazi podatkov (Dégrange in sod., 2009; Qu in sod., 2013b).

Kadar genotipiziramo bakterijo *M. pneumoniae* z izvedbo metode MLVA uporabljamo pet označevalcev nukleotidnega zaporedja genoma bakterije, in sicer Mpn1, Mpn13, Mpn14, Mpn15 in Mpn16, ki so v genomu bakterije prisotni med 111 920. in 736 123. baznim parom. Produkti PCR, ki jih pomnožimo pred analizo, so veliki od 219 do 419 bp. Na podlagi dolžin lokusov lahko določimo število ponovitev v posameznem lokusu. Trenutno je poznanih več kot 26 tipov MLVA pri bakteriji *M. pneumoniae* (Dégrange in sod., 2009; Qu in sod., 2013b).

Večina sekvenčnih metod, ki jih uporabljamo za genotipizacijo bakterije *M. pneumoniae*, omogoča spoznavanje sprememb znotraj gena MPN141. Ta gen, ki kodira beljakovino P1, vsebuje dva DNA elementa, RepMP2/3 in RepMP4, ki se spreminja med posameznimi sevi bakterije *M. pneumoniae*. Razlika v sekvenkah med tipoma 1 in 2 ni nujno vezana samo na gen MPN141, ampak jo lahko dokažemo na katerem koli RepMP elementu v genomu (Spuesens in sod., 2010). Dumke in sod. (2006) so uspeli tipizirati izolate na podlagi 401 bp dolgega dela elementa RepMP2/3 v genu P1.

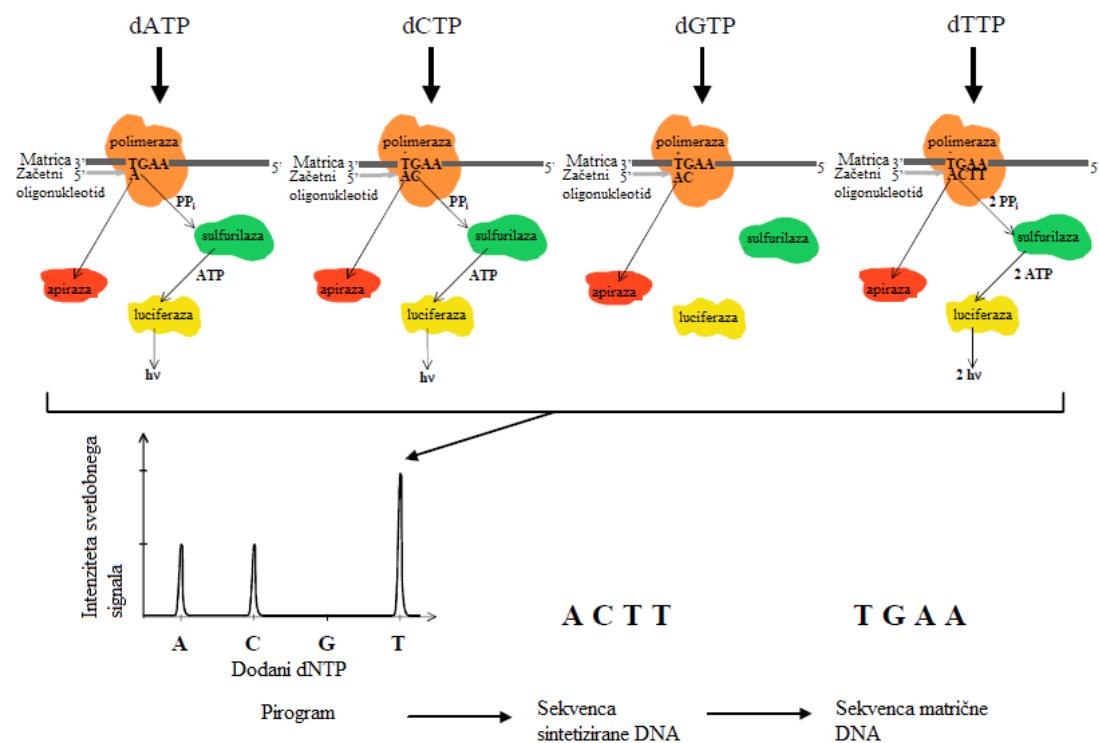
Pri analizi nukleotidnega zaporedja gena P1 primerjamo dobljene sekvene z že znanima sekvenama. Referenčna sekvenca za tip 1 je sekvenca *M. pneumoniae* M129 in za tip 2 sekvenca *M. pneumoniae* FH (Dumke in sod., 2006; Schwartz in sod., 2009; Cousin-Allery in sod., 2000; Kenri in sod., 1999). Sekvenci *M. pneumoniae* tipa 1 in tipa 2 se razlikujeta v polimorfizmu posameznega nukleotida v genu MPN141 in v genu MPN528a (Spuesens in

sod., 2010). Za razlikovanje med obema tipoma bakterije *M. pneumoniae* so Spuesens in sodelavci (2010) razvili dve metodi pirosekvciranja. Prva je temeljila na tipsko specifičnem nukleotidu na mestu 184 991 v sekvenci genoma *M. pneumoniae* M129. Na tem mestu, ki je v ohranjeni regiji blizu 3' konca gena MPN141, je v tipu 1 prisoten timin in v tipu 2 citozin. Metodo pirosekvciranja so uporabili za ugotavljanje tipsko specifičnega nukleotida v genu MPN528a na mestu 650 584 genoma *M. pneumoniae* M129. V genu MPN528a je prisoten adenin v tipu 1 in citozin v tipu 2.

Pirosekvciranje, ki omogoča razlikovanje posameznih tipov 1 in 2 bakterije *M. pneumoniae*, je metoda, ki omogoča določanja nukleotidnega zaporedja na principu sekvciranja s sintezo. Metoda je zgrajena na opazovanju sinteze DNA v realnem času, kjer se ob vstavitvi nukleotida sprosti svetlobni signal (bioluminiscenca). Sekvciranje s sintezo je bilo prvič opisano leta 1985. Tehnika temelji na sekvenčnem dodajanju nukleotidov matrični DNA in sekvenca matrice je povzeta po vrstnem redu dodajanja nukleotidov, ki se veže v nastajajočo verigo DNA. Nyrén je leta 1987 opisal kako se lahko aktivnost DNA polimeraze spremlja z bioluminiscenco. Danes se uporablajo pri sekvciranju s sintezo nukleotidi označeni s fluorescenco (Ahmadian in sod., 2006).

Osnovni princip pirosekvciranja je, da najprej izberemo DNA, ki jo želimo sekvcirat. Nato ustvarimo produkt PCR z vezanim biotinom na 5' koncu. Sledi obdelava produkta PCR, da dobimo enoverižno DNA. Na enoverižno DNA z vezanim biotinom nato nalegamo sekvenčni začetni oligonukleotid. Sledi sekvciranje in analiza rezultatov (Spuesens in sod., 2010).

Za izvedbo pirosekvciranja uporabljamo štiri encime, in sicer Klenow fragment DNA polimeraze, ATP sulfurično kislino, luciferazo in apirazo (sl. 5). V reakcijski mešanici je prisoten še substrat adenozin fosfatosulfat, d-luciferin in sekvenčna matrica z vezanim začetnim oligonukleotidom. Najprej poteče reakcija polimerizacije DNA, ko se dodan nukleotid veže v bazni par z nukleotidom sekvenčne matrice. Pri tem sodeluje DNA polimeraza, ob koncu reakcije pa se sprosti pirofosfat. Slednji služi kot substrat za ATP sulfurično kislino, da poteče reakcija nastanka ATP. V tretji in četrti reakciji se ATP pretvori v svetlobni signal z encimom luciferazo. Do tega sklopa encimske reakcij pride le, če je bil v prvi reakciji vstavljen pravi nukleotid. Naprava nato zazna sproščen svetlobni signal. Na koncu apiraza odstrani nukleotide, ki se niso vezali v nastajajočo verigo DNA. Signal je lahko kvantitativno povezan s številom dodanih nukleotidov. Trenutno je metoda omejena na analizo kratkih sekvc DNA in je zato primerna predvsem za analizo polimorfizmov posameznega nukleotida in krajevih odsekov DNA za genotipizacijo (Ahmadian in sod., 2006).



Slika 5: Potek pirosekvenciranja (rdeča = apiraza, zelena = sulfurilaza in rumena = luciferaza) (Ahmadian in sod., 2006)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski izolati

V raziskavi smo uporabili seve bakterije *M. pneumoniae*, ki so bili izolirani iz kužnin bolnikov z okužbami dihal v obdobju od 2006 do 2013 v Laboratoriju za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo ter shranjeni pri -80 °C. V tem obdobju je bilo z metodo PCR dokazanih 535 okužb z bakterijo *M. pneumoniae*. Iz kužnin, ki so bile s testom PCR pozitivne, so v laboratoriju izolirali *M. pneumoniae* v 282 kužninah. Te izolate smo nato uporabili v naši magistrski nalogi (pregl. 6).

Preglednica 6: Značilnosti vzorcev uporabljenih v raziskavi

Leto	Število vzorcev	Število vzorcev	Vrste kužnine
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (PCR pozitivni)	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (kulturna pozitivni)	
2006	10	3	60 % bris žrela 20 % aspirat sapnice 10 % BAL* 10 % bris nazofarinkska
2007	19	13	95 % bris žrela 5 % bris nebnic
2008	16	7	82 % bris žrela 6 % aspirat sapnice 6 % izpirek žrela 6 % izmeček
2009	48	33	90 % bris žrela 8 % bris nazofarinkska 2 % bris nebnic
2010	221	110	86 % bris žrela 12 % bris nazofarinkska 0,5 % aspirat sapnice 0,5 % bris nebnic 0,5 % BAL 0,5 % izmeček
2011	117	51	94 % bris žrela 4 % bris nazofarinkska 1 % bris nebnic 1 % izmeček
2012	46	28	89 % bris žrela 7 % bris nazofarinkska 2 % aspirat sapnice 2 % BAL
2013	62	37	87 % bris žrela 13 % bris nazofarinska
SKUPAJ	539	282	

*BAL = bronhoalveolarna lavaža

3.1.2 Gojišča

- transportno gojišče za mikoplazme U.m.m.t (EliTech, Francija)
- tekoče in trdo gojišče (oxoid) za kultivacijo *M. pneumoniae*

3.1.3 Reagenti

- voda za molekularno biologijo (Qiagen, Nemčija)
- pufer TAE (Tris, acetat, EDTA)
- pufer za lizo bakterij BLB (Roche, Nemčija)
- barvilo SYBR® Safe DNA Gel Stain 10x (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, ZDA)
- GeneRuler 100bp (Fermentas, ZDA)
- agarosa: Agarose, For routine use (Sigma-Aldrich, ZDA)
- 10× PCR Gold Pufer no MgCl₂ (Applied Biosystems, ZDA),
- MgCl₂ (Applied Biosystems, ZDA),
- vezavni pufer za pripravo produktov PCR za pirosekvenciranje (Biotage, Švedska)
- izpiralni pufer za pripravo produktov PCR za pirosekvenciranje (Biotage, Švedska)
- "annealing pufer" za pripravo produktov PCR za pirosekvenciranje (Biotage, Švedska)
- MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche, Nemčija)
- Proteinaza K (Roche, nemčija)
- Taq polimeraza (Applied Biosystems, ZDA)
- PyroMark Gold Q96 SQA (Qiagen, Nemčija)

3.1.4 Začetni oligonukleotidi

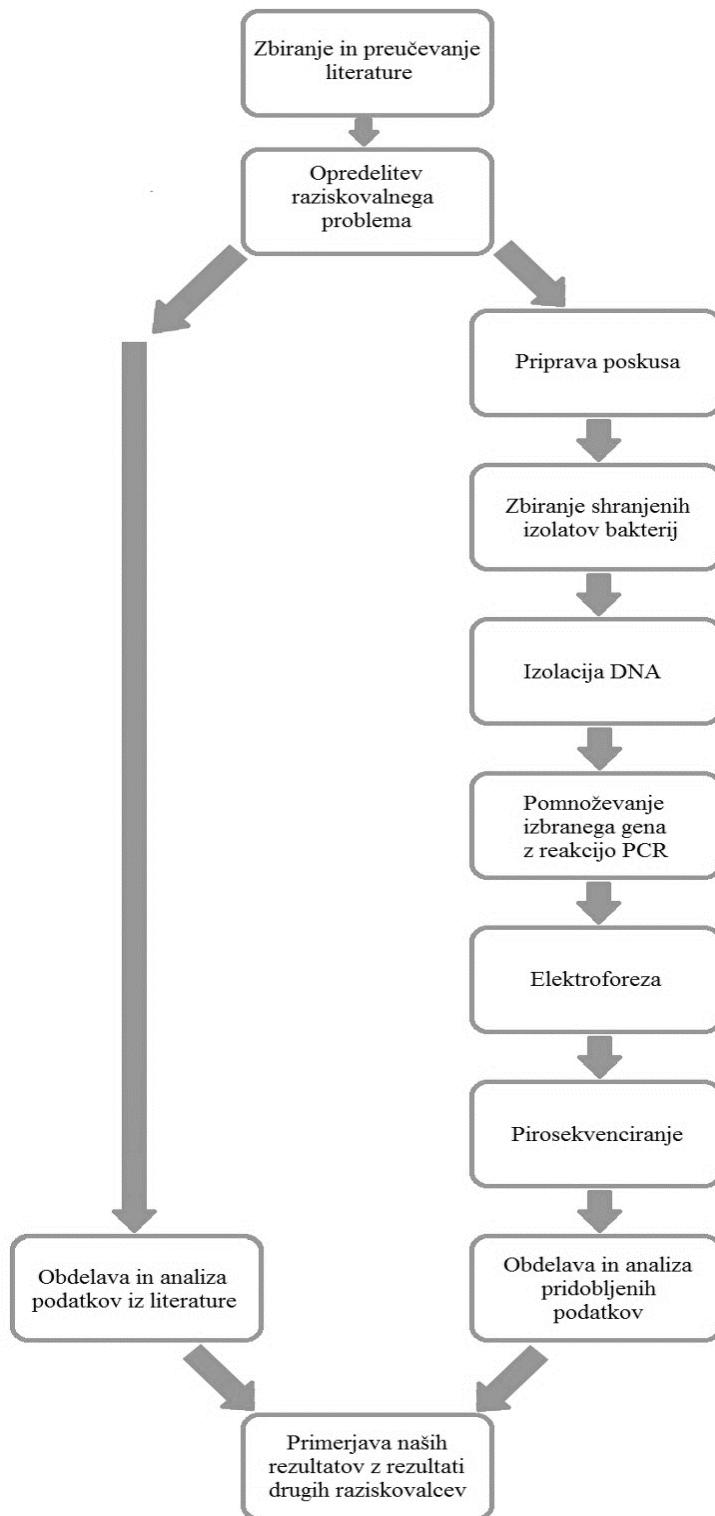
- dNTPmix (Applied Biosystems, ZDA)
- MPN141 forward povzet po [Spuesens in sod., 2010] (TIB Molbiol, Nemčija)
- MPN141 reverse povzet po [Spuesens in sod., 2010] (TIB Molbiol, Nemčija)
- MPN141 sekvenčni povzet po [Spuesens in sod., 2010] (TIB Molbiol, Nemčija)
- MPN528a forward povzet po [Spuesens in sod., 2010] (TIB Molbiol, Nemčija)
- MPN528a reverse povzet po [Spuesens in sod., 2010] (TIB Molbiol, Nemčija)
- MPN528a sekvenčni povzet po [Spuesens in sod., 2010] (TIB Molbiol, Nemčija)

3.1.5 Oprema

- epruvete
- erlenmajerice
- mikrocentrifugirke, plastične tubice
- mikrotitrske plošče (8x12)
- kalibrirane pipete in nastavki za pipete
- inkubator

- centrifuga (Eppendorf, Nemčija)
- minicentrifuga
- laboratorijski vibrator
- termostresalnik
- stresalnik plošč PCR
- kadičke, glavnički in plastični model za elektroforezo
- mikrovalovna pečica
- elektroforezni sistem
- aparatura Gel-Doc 2000 (Bio-Rad, Nemčija)
- parafilm
- MagNA Pure Compact (Roche, Nemčija)
- naprava za PCR: Veriti Thermal Cycler (AppliedBiosystems, ZDA)
- naprava za PCR: T3000 Thermocycler (Biometra, Nemčija)
- naprava za pirosekvenciranje: PyroMark Q96 ID (Biotage, Švedska)

3.2 SHEMA DELA



Slika 6: Shema poteka dela

3.3 METODE

3.3.1 Izolacija DNA

Za izolacijo DNA smo uporabili 200 µL kulture bakterij iz tekočega gojišča za mikoplazme in jo centrifugirali. Usedlino smo resuspendirali s 180 µL pufra BLB (bacteria lysis buffer) in dodali 20 µL proteinaze K. Vzorce smo inkubirali 10 minut pri 65 °C in nato še za 10 minut pri 95 °C. Izolacijo DNA smo izvedli z reagenti MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche, Nemčija) in v aparaturi MagNA Pure Compact (Roche, Nemčija) v 200 µL elucijskega pufra. Izolirano DNA smo do reakcije PCR shranili pri -20 °C.

3.3.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za amplifikacijo dela gena MPN141 in MPN528a smo izvedli ločeni reakciji PCR. Reakcijski mešanici in program pomnoževanja smo povzeli po Spuesens in sod. (2010) z manjšimi spremembami. Povečali smo volumen reakcije iz 25 µL na 50 µL, zmanjšali koncentracijo MgCl₂ za amplifikacijo MPN528a iz 3,5 mM na 1,5 mM in podaljšali amplifikacijski program s 30 na 50 ciklov. Za pomnoževanje smo pri obeh reakcijskih mešanicah uporabili 5 µL izolirane DNA. Podrobna sestava reakcijskih mešanic in pomnoževalnega programa je prikazana v preglednicah 7, 8, 9 in 10. Reakcijo PCR smo izvedli v aparaturi T3000 Thermocycler (Biometra, Nemčija) ali Veriti Thermal Cycler (AppliedBiosystems, ZDA).

Preglednica 7: Reakcijska mešanica za pomnoževanje dela gena MPN141

Reagent	Končna koncentracija	Volumen za 1 vzorec
PCR Gold Pufer no MgCl ₂	1×	5 µL
dNTPmix (10mM each)	200 µM	1 µL
Primer Mpn141_F – 15 µM	0,6 µM	2 µL
Primer Mpn141_R – 15 µM	0,6 µM	2 µL
MgCl ₂ (25mM)	1,0 mM	2 µL
H ₂ O	do 45 µL	32,75 µL
Taq polimeraza (5U/µL)	1,25 U/reakcijo	0,25 µL

Preglednica 8: Reakcijska mešanica za pomnoževanje dela gena MPN528a

Reagent	Končna koncentracija	Volumen za 1 vzorec
PCR Gold Pufer no MgCl ₂	1×	5 µL
dNTPmix (10mM each)	200 µM	1 µL
Primer Mpn528a_F – 10 µM	0,4 µM	2 µL
Primer Mpn528a_R – 20 µM	0,8 µM	2 µL
MgCl ₂ (25mM)	1,5 mM	3 µL
H ₂ O	do 48 µL	31,75 µL
Taq polimeraza (5U/µL)	1,25 U/reakcijo	0,25 µL

Preglednica 9: Amplifikacijski pogoji za gen MPN141

Aktivacija	95 °C	300 sekund	1×
Denaturacija	94 °C	10 sekund	
Naleganje	55 °C	30 sekund	
Podaljševanje	72 °C	15 sekund	
Končno podaljševanje	72 °C	600 sekund	1×
Hlajenje	4 °C	neskončno	

Preglednica 10: Amplifikacijski pogoji za gen MPN528a

Aktivacija	95 °C	300 sekund	1×
Denaturacija	94 °C	10 sekund	
Naleganje	52 °C	30 sekund	
Podaljševanje	72 °C	12 sekund	
Končno podaljševanje	72 °C	600 sekund	1×
Hlajenje	4 °C	neskončno	

3.3.3 Elektroforeza DNA v agaroznem gelu

Pridelke reakcije PCR smo ločili po velikosti v 1 % agaroznem gelu obarvanem z 1× SYBR Safe (LifeTechnologies, ZDA). Za določanje velikosti pridelkov smo uporabili GeneRuler 100bp (Fermentas, ZDA). Pridelke PCR smo vizualizirali z aparaturom Gel-Doc 2000 (Bio-Rad, Nemčija). Za gen MPN141 smo pričakovali produkt velikosti 84 bp in za gen MPN528a 166bp.

3.3.4 Pirosekvinciranje

Pred samim postopkom pirosekvinciranja smo pridelke PCR prečistili po protokolu predpisanim s strani proizvajalca. Pridelkom PCR v volumnu 20 µL smo dodali 3 µL sefaroznih kroglic z vezanim streptavidinom (GE Healthcare, ZDA), 17 µL vode in 40 µL vezavnega pufrja.

Prečiščen in na streptavidinske kroglice vezan produkt PCR smo prenesli v ploščico za pirosekvinciranje in jo 2 minuti inkubirali pri 80 °C. Po inkubaciji smo ploščo pustili pri sobni temperaturi, da se je počasi ohladila.

Nato smo ploščo 15 minut stresali pri 1400 obratih/minuto na stresalniku MixMate (Eppendorf, Nemčija). V tem času smo pripravili mikrotitrsko ploščico za pirosekvinciranje, kamor smo v vsako vdolbinico dali po 40 µL vezavnega pufrja, ki je vseboval 0,4 µM sekvenčni oligonuleotidni začetnik.

Med ohlajanjem plošče za pirosekvinciranje smo po navodilih proizvajalca pripravili reagente PyroMark Gold Q96 SQA (Qiagen, Nemčija) in jih odpipetirali na ustrezna mesta v kartušo za pirosekvinciranje. Pirosekvinciranje smo izvedli v aparaturi PyroMarkID

(Biotage, Švedska). Po končanem programu smo pridobljene sekvence shranili za nadaljnjo obdelavo.

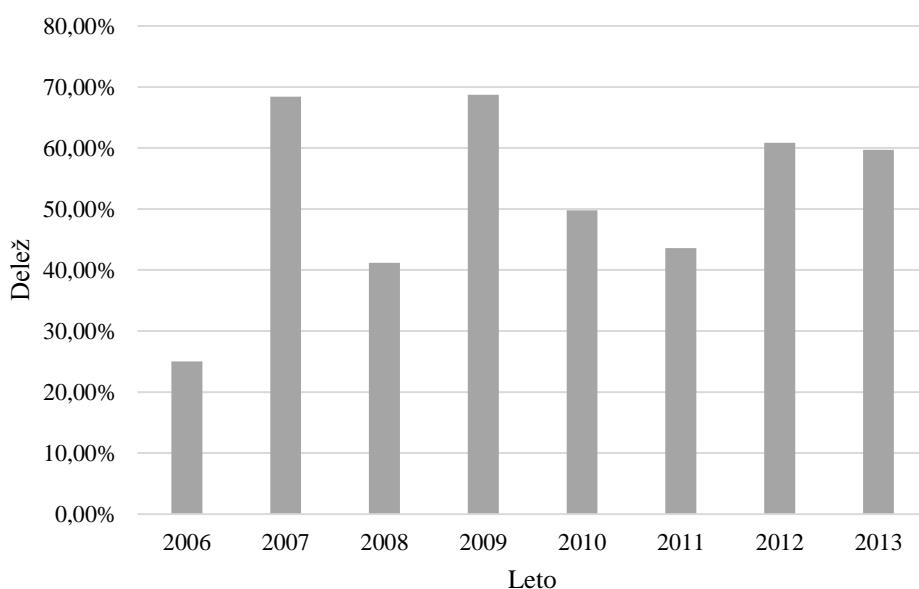
3.3.4.1 Obdelava podatkov in genotipizacija

Interpretacijo rezultatov in določitev genotipa smo izvedli z namensko programsko opremo Identifire (Biotage, Švedska). Podatke smo obdelali s programom Microsoft Excel in jih pretvorili v tabele in grafe.

4 REZULTATI

Iz 282 shranjenih izolatov bakterije *M. pneumoniae* smo izolirali DNA, nato pa smo z reakcijo PCR pomnožili gena MPN141 in MPN528a. Slednja smo nato pirosekvencirali, saj smo želeli določiti kateri tip bakterije *M. pneumoniae* je prevladoval pred epidemijo, med samo epidemijo in po njej.

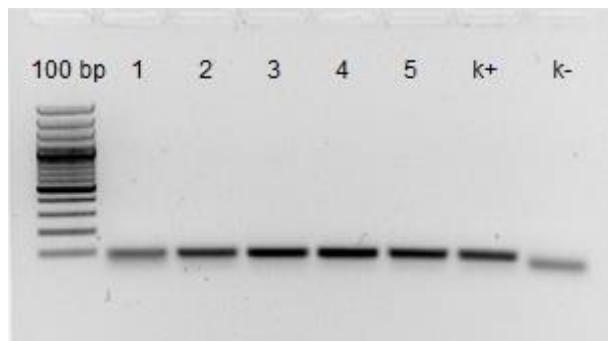
Določili smo občutljivost metode kultivacije *M. pneumoniae* v primerjavi z metodo PCR. V našem primeru je uspešnost izolacije skozi leta nihala, kar je prikazano na sliki 7.



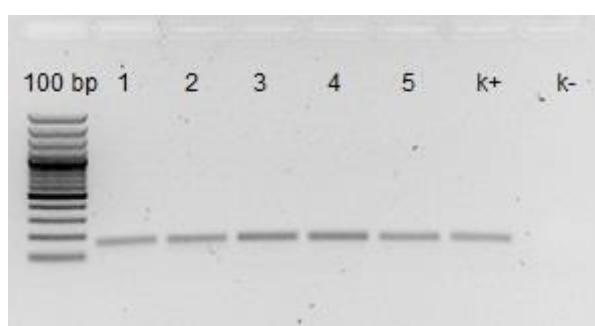
Slika 7: Delež uspešno kultiviranih vzorcev bakterije *Mycoplasma pneumoniae* v posameznem letu

4.1 REAKCIJA PCR GENOV MPN141 IN MPN528A

Izolacijo DNA *M. pneumoniae* smo izvedli iz 282 kultur v tekočem gojišču. Odseke izbranega gena smo nato pomnožili z reakcijo PCR. Po končani reakciji PCR smo z elektroforezo preverili, ali se je pomnožil izbran odsek DNA. Za gen MPN141 smo pričakovali produkt PCR v velikosti 84 bp, za gen MPN528a pa 166 bp. Na sliki 8 je primer elektroforeze produktov reakcije PCR gena MPN141, slika 9 pa prikazuje primer elektroforeze produktov reakcije PCR gena MPN528a. Pridelke reakcije PCR smo dobili pri 277 vzorcih.



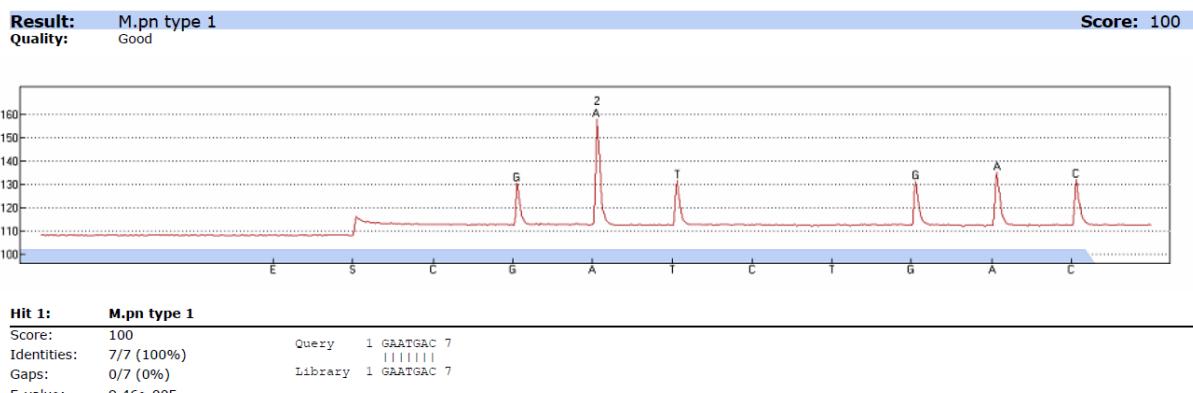
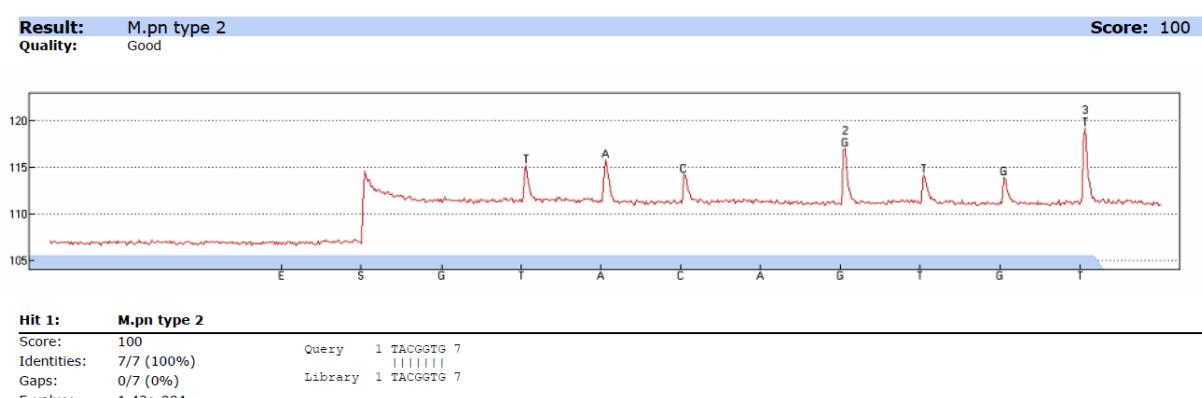
Slika 8: Primer elektroforeze produktov gena MPN141 petih vzorcev s pozitivno (k+) in negativno kontrolo (k-) ob markerju 100 bp



Slika 9: Primer elektroforeze produktov gena MPN528a petih vzorcev s pozitivno (k+) in negativno kontrolo (k-) ob markerju 100 bp

4.2 GENOTIPIZACIJA BAKTERIJE *MYCOPLASMA PNEUMONIAE* S PIROSEKVENCIRANJEM

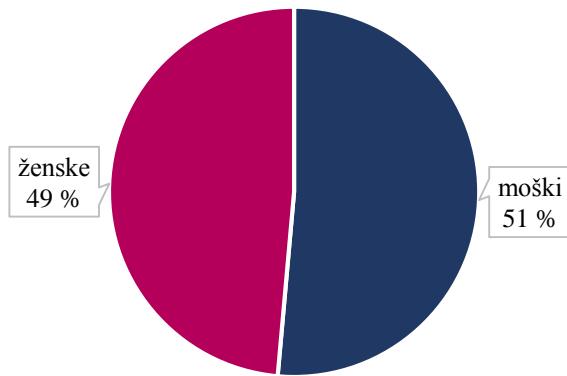
S pirosekvenciranjem smo genotipizirali 277 izolatov *M. pneumoniae*, pri katerih smo z elektroforezo dokazali prisotnost pridelkov PCR za posamezen odsek gena. Rezultate pirosekvenciranja smo obdelali s programom Identifire, ki nam je kot končne rezultate podal piktoograf z analizo. Primer piktoografa sta sliki 10 in 11. Slika 10 prikazuje rezultate za genotipizacijo gena MPN141 bakterije *M. pneumoniae* P1 tipa 1, slika 11 pa rezultate genotipizacije gena MPN528a bakterije *M. pneumoniae* P1 tipa 2. S pirosekvenciranjem smo uspešno določili tip *M. pneumoniae* pri 277 vzorcih od 282 (97,16 % uspešnost). Uspešnejše je bilo določanje tipa *M. pneumoniae* z genom MPN141, kjer smo uspeli določiti tip vsem 277 pirosekvenciranim vzorcem. Z genom MPN528a smo uspeli tipizirati 259 vzorcev (91,84 %). Ujemanje tipov uspešno določenih z genom MPN141 in tipov uspešno določenih z genom MPN528a je 100 %.

Slika 10: Primer piktografa genotipizacije gena MPN141 bakterije *Mycoplasma pneumoniae* tip 1Slika 11: Primer piktografa genotipizacije gena MPN528a bakterije *Mycoplasma pneumoniae* tip 2

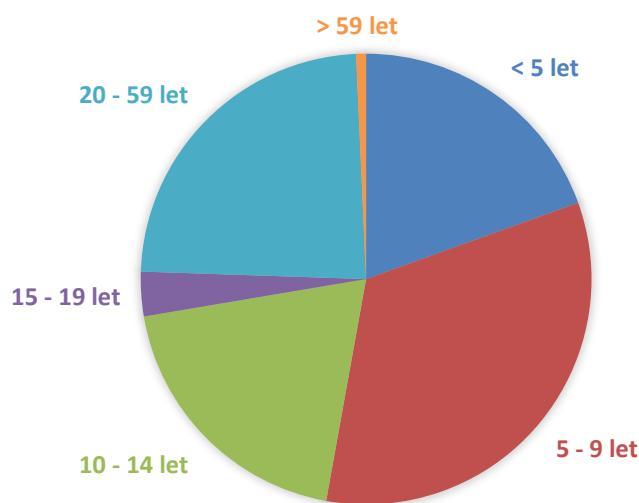
Genotipizacijo smo uspešno izvedli pri 277 izolatih *M. pneumoniae*, pri 15 vzorcih pa nismo uspeli pirosekvencirati le odsek gena MPN528a. Kljub ponovljenim reakcijam PCR, smo z elektroforezo pokazali, da je produkt gena MPN141 manjši od pričakovanega, odsek gena MPN528a pa nam ni uspelo pomnožiti. Iz petih izolatov smo kultivirane bakterije ponovno prenesli v tekoče gojišče za mikoplazme in jih inkubirali do 21 dni pri 37 °C. V nobenem gojišču ni prišlo do spremembe barve v zeleno, ki bi nakazovala na razmnoževanje bakterije *M. pneumoniae*. Pri treh od petih vzorcev (2912/10, 5307/10 in 331/11) smo s pirosekvenciranjem gena MPN141 dokazali na sočasno prisotnost obeh tipov *M. pneumoniae*, pri vzorcih 2912/10 in 331/11 smo rezultat potrdili tudi pri pirosekvenciranju gena MPN528a.

4.3 DEMOGRAFSKE ZNAČILNOSTI ANALIZIRANIH IZOLATOV

Za našo raziskavo smo pridobili 282 izolatov *M. pneumoniae* iz obdobja 2006–2013. *Mycoplasma pneumoniae* je bila izolirana iz kužnin, ki so bile odvzete v 49 % od pacientk in v 51 % od bolnikov moškega spola (sl. 12).

Slika 12: Delež pripadnikov posameznega spola v naši raziskavi okuženih z bakterijo *Mycoplasma pneumoniae*

Bakterija *M. pneumoniae* najpogosteje povzroča okužbe pri otrocih in mladostnikih. Podatki zbrani na sliki 13 kažejo, da je tudi pri nas večina vzorcev pripadala otrokom mlajšim od 15 let. V skupini slednjih je bilo opaziti tudi, da je največji delež okuženih starih med 5 in 9 let (33,3 % vseh vzorcev). Okuženim v starostnima skupinama mlajših od 5 let in starimi od 10 do 14 let je pripadalo 19,5 % vzorcev. Odraslih med 20. in 59. letom starosti je 23,8 %. Manj zastopani starostni skupini sta mladostniki stari med 15 in 19 let (3,2 %) in starejši od 59 let (0,7 %).

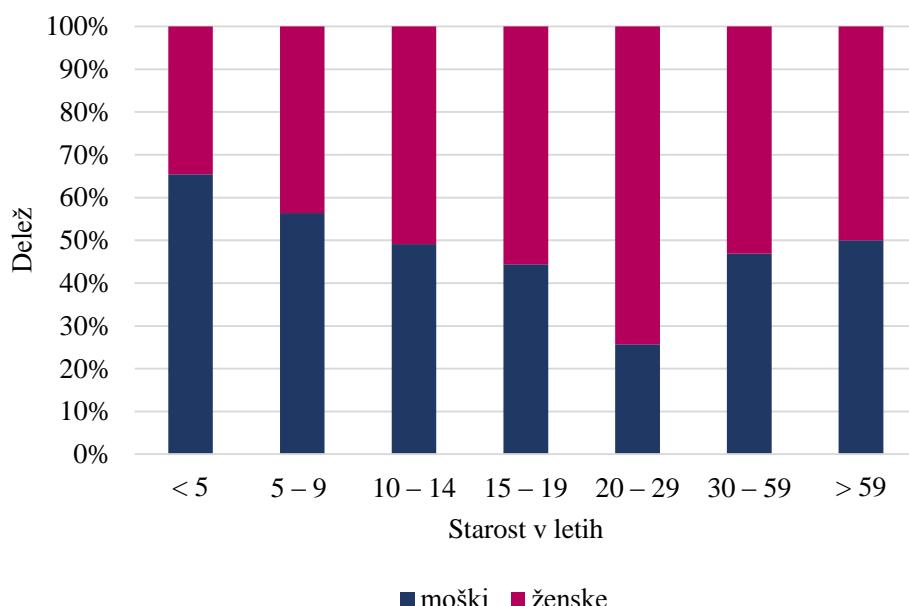
Slika 13: Porazdelitev okuženih bolnikov z bakterijo *Mycoplasma pneumoniae* po starostnih skupinah

Ugotovili smo, da je večji delež okuženih otrok moškega spola, med tem ko pri odraslih starih nad 20 let prevladuje več okužb pri ženskah (pregl. 11).

Preglednica 11: Število pripadnikov posameznega spola v posamezni starostni skupini

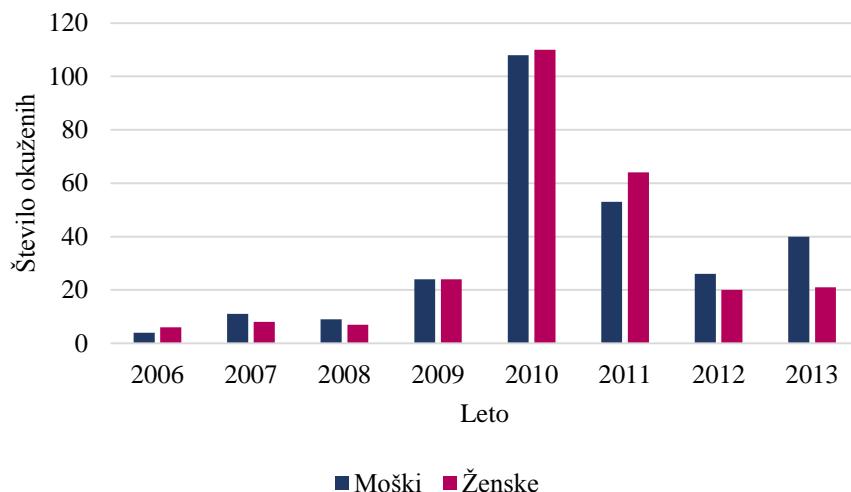
Starost (leta)	Vsi testirani	Moški	Ženske
< 5	55	36	19
5 - 9	94	53	41
10 - 14	55	27	28
15 - 19	9	4	5
20 - 59	67	24	43
> 59	2	1	1

Podatki so grafično prikazani na sliki 14, kjer je lepo opazno gibanje razmerja spolov, kjer z naraščajočo starostjo narašča delež ženske populacije. Pri starostni skupini starejših od 59 let zaradi majhnega števila vzorcev (2 vzorca) podatki niso relevantni.



Slika 14: Razmerje spolov okuženih v različnih starostnih skupinah

Primerjava števila okuženih z bakterijo *M. pneumoniae* glede na spol v posameznem letu (sl. 15) kaže, da so ob začetku epidemije in v epidemičnem letu 2010 rahlo prevladovale okužbe pri ženskah. V letih, ko ni bilo epidemije okužb z bakterijo *M. pneumoniae* pa lahko opazimo več okužb pri pripadnikih moškega spola.

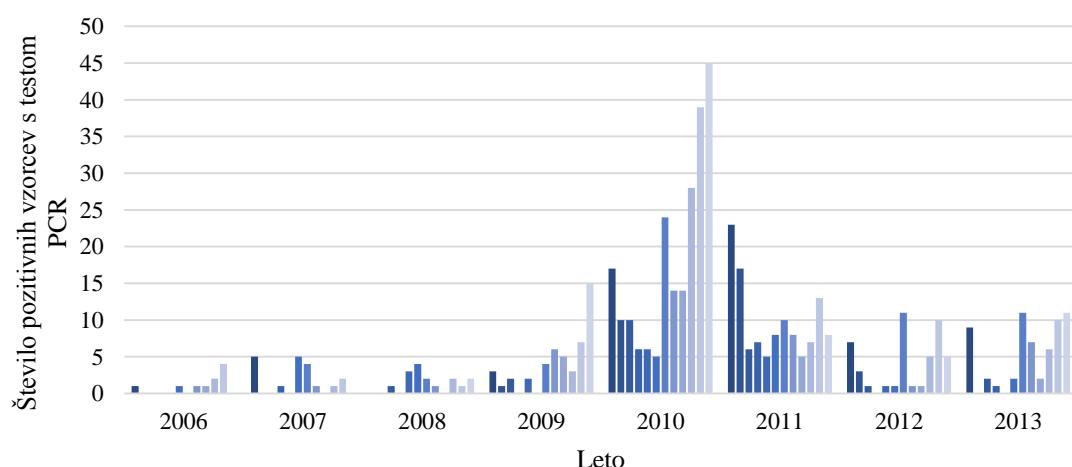


Slika 15: Število dokazanih okužb z *Mycoplasma pneumoniae* s testom PCR pri moških in ženskah v posameznem letu

4.4 EPIDEMIJA V SLOVENIJI

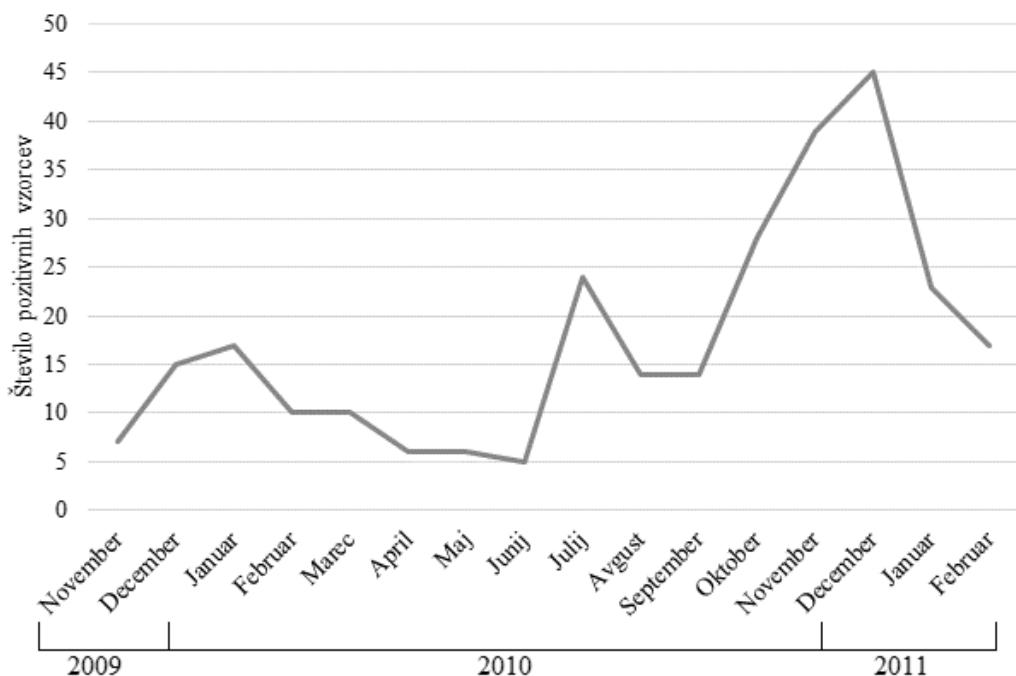
V času od novembra 2009 do februarja 2011 smo ugotovili povečano število okužb z bakterijo *M. pneumoniae*, kar je nakazovalo na epidemijo (sl. 16). Prvo povečanje števila okuženih oseb je opaziti konec leta 2009, v začetku leta 2010 je število upadlo, nato se poleti ponovno povečalo in jeseni močno poskočilo. Vrh epidemije je bil pozimi 2010/11, nato pa je število vzorcev spomladti začelo upadati. Konec epidemije smo določili s koncem februarja 2011.

Za bakterijo *M. pneumoniae* so značilne tudi okužbe v poletnem času. Opazili smo povečanje števila okužb predvsem v juliju in avgustu skoraj vsako leto, drugo povečanje pa smo opazili v zimskem času med novembrom in januarjem.



Slika 16: Število pozitivnih vzorcev s testom PCR med letoma 2006 in 2013

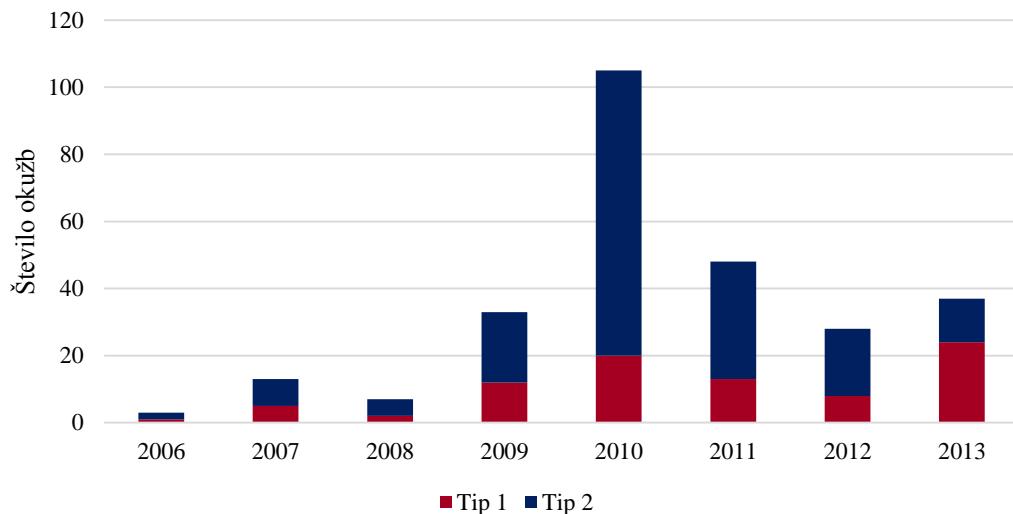
Med samo epidemijo okužb je opazno nihanje števila vzorcev bolnikov, pri katerih smo s testom PCR dokazali okužbo z *M. pneumoniae*. Največje število okužb z bakterijo *M. pneumoniae* je bilo med zimo 2010/11, manjše povečanje pa je bilo opazno tudi v zimskem času 2009/2010 in v poletnih sezona 2010 in 2011 (sl. 17).



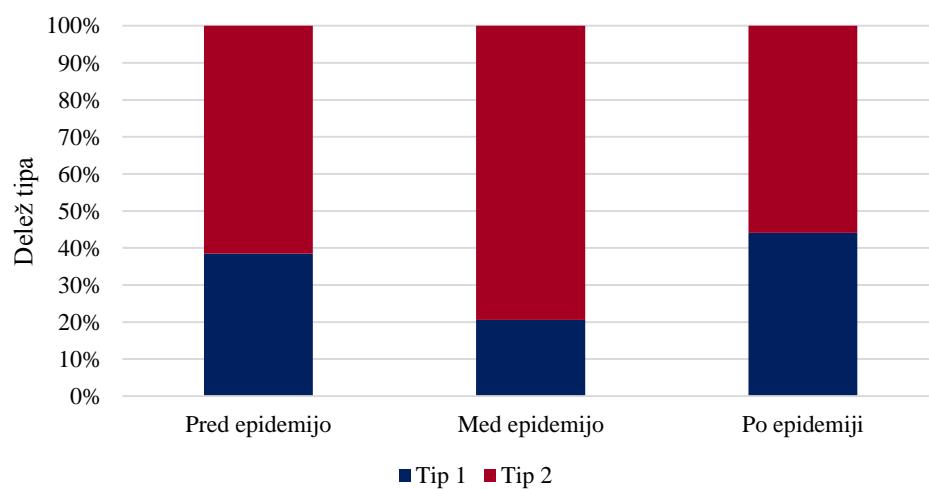
Slika 17: Gibanje števila pozitivnih vzorcev z metodo PCR med epidemijo okužb z bakterijo *Mycoplasma pneumoniae* od novembra 2009 do februarja 2011

Od 2007 do vključno leta 2012 so prevladovale okužbe z bakterijo *M. pneumoniae* tipa 2, ki je v veliki meri tudi povzročila epidemijo med letoma 2010 in 2011. Delež okužb z bakterijo *M. pneumoniae* posameznega tipa sicer skozi leta niha, a opazen je določen vzorec. Pred epidemijo in po njej smo opazili, da je prevladujoči tip bakterije odgovoren za približno 2/3 okužb. Pred epidemijo je tako 2/3 okužb povzročenih s tipom 2 bakterije *M. pneumoniae*. Precej opazna je sprememba okužb z bakterijo *M. pneumoniae* tipa 1, ki se je zgodila v letu 2013, ko je bil tip 1 odgovoren za 2/3 delež okužb.

V času med epidemijo in prvo leto po njej je opaziti, da je število okužb s tipom 1 bakterije *M. pneumoniae* ostajalo približno enako. Močno se je povečalo število okužb s tipom 2, predvsem leta 2010, ko je bil vrhunec epidemije. Leta 2013 se je povečalo število okužb z bakterijo *M. pneumoniae* tip 1 in tudi število vseh okužb (z obema tipoma) je rahlo višje kot leto poprej (sl. 18).

Slika 18: Število okuženih s posameznim tipom *Mycoplasma pneumoniae* med letom 2006 in 2013

V času epidemije od novembra 2009 do konca februarja 2011 je prevladoval tip 2 bakterije *M. pneumoniae*. Delež bakterije *M. pneumoniae* tip 2 je bil v tem obdobju kar 79,4 %. Razmerje tipov se nato po epidemiji začelo približevati izenačitvi, kar je vidno na sliki 19.

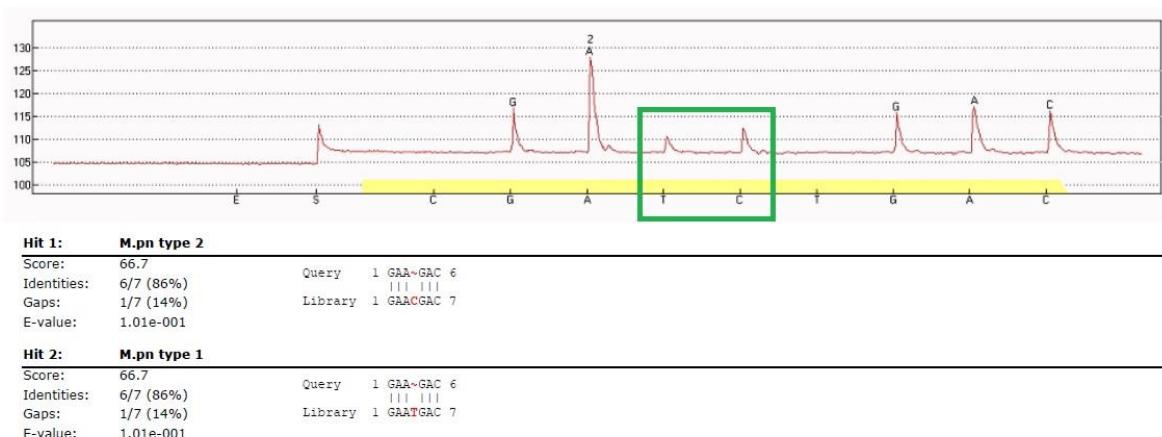
Slika 19: Delež posameznega tipa *Mycoplasma pneumoniae* pred epidemijo, med njo in po koncu epidemije

Preglednica 12 vsebuje zbrane podatke genotipizacije bakterije *M. pneumoniae*, ki so razdeljeni glede na leto okužbe in starostno skupino, v katero smo uvrstili bolnika. Opazimo večje število okužb v letu 2010. Ravno tako je večje število okužb opaziti pri otrocih in mladostnikih mlajših od 15 let. Zelo malo je okužb v starostni skupini srednješolcev. V letu 2010 je večje število okužb z bakterijo *M. pneumoniae* tip 2. Ponovno pa lahko opazimo tudi zamenjavo tipov v letu 2013, ko se poveča število okužb z bakterijo tipa 1.

Preglednica 12: Razporeditev števila okužb s posameznim tipom bakterije *Mycoplasma pneumoniae* po letih in starostnih skupinah

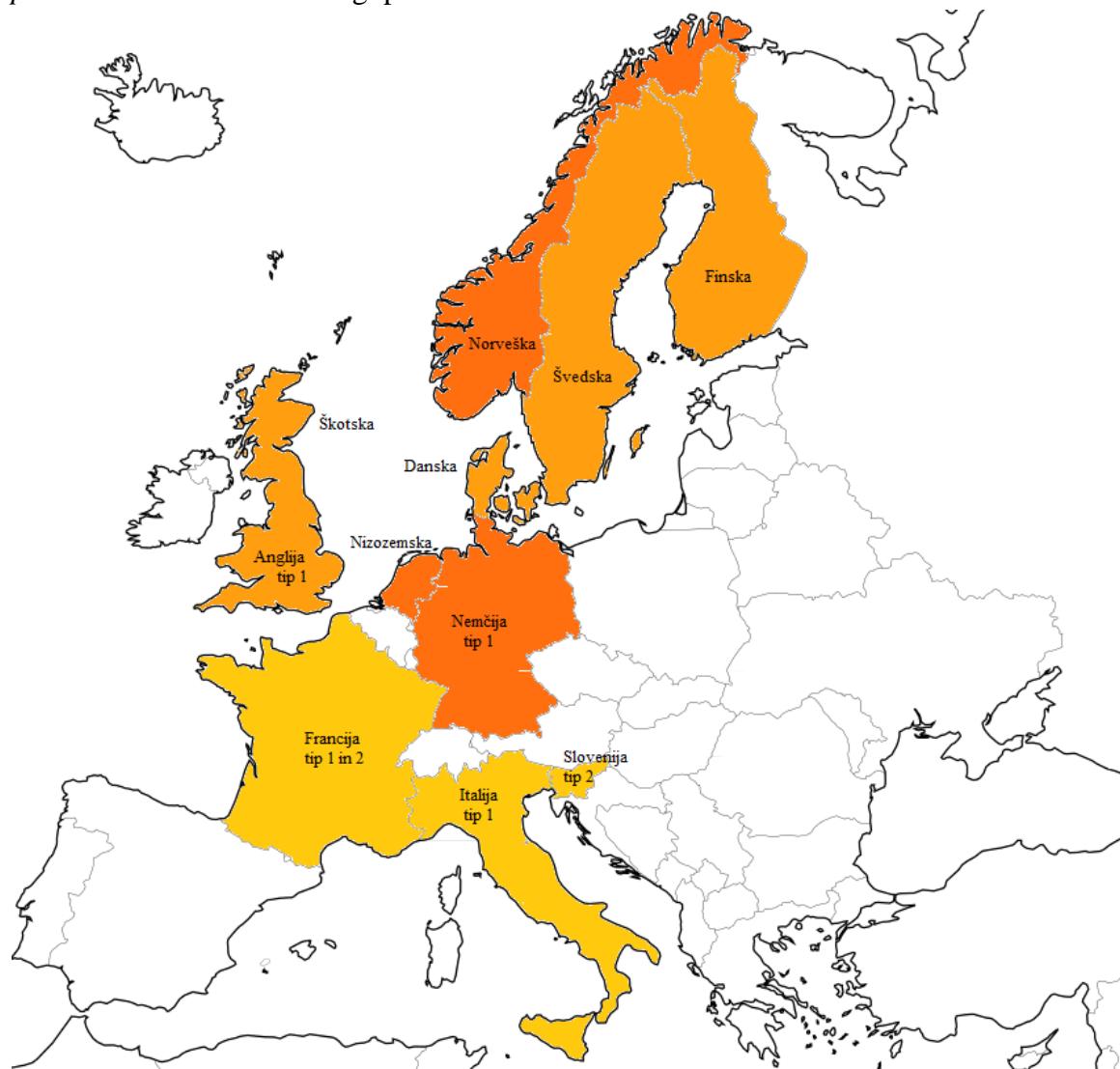
	2006		2007		2008		2009		2010		2011		2012		2013	
	št. okužb		št. okužb		št. okužb		št. okužb		št. okužb		št. okužb		št. okužb		št. okužb	
Starost (leta)	tip 1	tip 2	tip 1	tip 2	tip 1	tip 2	tip 1	tip 2	tip 1	tip 2						
< 5 let	1	1	0	2	0	2	3	4	3	12	3	7	2	3	8	1
5–9 let	0	1	2	4	2	3	4	5	5	33	4	11	1	7	9	1
10–14 let	0	0	2	2	0	0	4	5	2	16	2	7	2	5	3	4
15–19 let	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	1	1	0	0	1	1
20–59 let	0	0	1	0	0	0	1	6	10	19	3	9	3	5	3	5
> 59 let	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Skupaj	1	2	5	8	2	5	12	21	20	85	13	35	8	20	24	13

Pri vzorcu 331/11 smo s pirosekvinciranjem gena MPN141 ugotovili prisotnost tako bakterije *M. pneumoniae* tipa 1 kot bakterije *M. pneumoniae* tipa 2. Rezultat se je nato ponovil tudi pri pirosekvinciranju gena MPN528a. Prisotnost obeh tipov smo dokazali s pirosekvinciranjem gena MPN141 in MPN528a tudi pri vzorcu 2912/10. Pri vzorcu 5307/10 pa nam je uspelo pirosekvincirati samo gen MPN141, kjer smo ravno tako dokazali bakterijo *M. pneumoniae* tip 1 in bakterijo *M. pneumoniae* tip 2. Rezultata pri tem vzorcu nismo uspeli potrditi z genom MPN528a. Slika 20 prikazuje rezultat pirosekvinciranja gena MPN141 vzorca 331/11. Zaporedne nukleotidov na mestu 184 988 – 184 994 v pirosekvinciranem delu genoma si sledi: GAAXGAC. Tip 1 ima na mestu 184 991 prisoten C, tip 2 pa T. Pri tem rezultatu je opazno, da sta prisotna oba.



Slika 20: Rezultat pirosekvinciranja gena MPN141 pri vzorcu 331/11

Zbrani podatki iz literature kažejo, da je bila epidemija okužb z bakterijo *M. pneumoniae* med letoma 2009 in 2012 v mnogih državah po Evropi. Na podlagi zbranih rezultatov iz literature (pregl. 4 in pregl. 5) smo ustvarili zemljevid (sl. 21), ki prikazuje začetek epidemije v posameznih evropskih državah in prevladajoč tip v državah, kjer so opravili genotipizacijo. Rumena barva označuje države kjer se je epidemija okužb z bakterijo *M. pneumoniae* začela konec leta 2009 ali v začetku leta 2010. S svetlo oranžno barvo smo pobarvali države, kjer so opazili začetek epidemije konec leta 2010 in v začetku leta 2011. Temno oranžna pa označuje začetek epidemije okužb z bakterijo *M. pneumoniae* v drugi polovici leta 2011.



Slika 21: Epidemija okužb z bakterijo *Mycoplasma pneumoniae* v Evropi med letoma 2009 in 2012. Rumena barva označuje države, kjer se je epidemija okužb z bakterijo *M. pneumoniae* začela konec leta 2009 ali v začetku leta 2010. S svetlo oranžno barvo kaže na začetek epidemije konec leta 2010 in v začetku leta 2011. Temno oranžna pa označuje začetek epidemije okužb z bakterijo *M. pneumoniae* v drugi polovici leta 2011.

5 RAZPRAVA

V naši nalogi smo želeli genotipizirati izolate bakterije *M. pneumoniae* zbrane med letoma 2006 in 2013. Iz zamrznjenih kultur bakterije smo izolirali DNA in nato z reakcijo PCR pomnožili gena MPN141 in MPN528a. Slednja nosita polimorfizem posameznega nukleotida značilen za genotip 1 ali 2 te bakterije. Pridelke reakcije PCR smo nato očistili in pirosekvencirali, pridobljene rezultate pa analizirali in primerjali s študijami drugih raziskovalcev.

Delež zunajbolnišničnih pljučnic, ki jih povzroča bakterija *M. pneumoniae* po podatkih različnih študij niha. To je posledica različnih dejavnikov. Rezultati so odvisni od tega, ali je bila študija opravljena v času epidemije ali ne, ali so v študijo vključeni pretežno otroci in mladostniki, pri katerih je okužba pogostejša, pomembna je metoda laboratorijske diagnostike, saj je kultivacija manj učinkovita metoda kot reakcija PCR.

Tudi število dokazanih okužb z *M. pneumoniae* je povezano z več dejavniki, med najpomembnejšimi je vsekakor čas (epidemije) in obveščenost zdravnikov o pogostosti in testiranju okužb z bakterijo *M. pneumoniae*. Pomembni so tudi laboratorijski testi in njihova občutljivost. Pred časom uporabe molekularnih metod, ko je delo slonelo na kultivaciji bakterije, je bilo do 40 % pozitivnih vzorcev spregledanih. Novejše in občutljivejše metode tako vodijo k večjemu številu odkritih okužb.

V laboratoriju so pred našo magistrsko raziskavo uspeli izolirati bakterijo *M. pneumoniae* pri 282 vzorcih od 535 vzorcev, ki so bili pozitivni s testom PCR, kar je 52 % uspešnost kultivacije. Waites in Talkington (2004) navajata uspešnost kultivacije *M. pneumoniae* do 60 %, kar se je pri nas tudi pokazalo. Sama uspešnost kultivacije bakterije je skozi leta nihala in je bila najnižja leta 2006 (25 %) in najvišja leta 2009 (68,75 %). Delno lahko višjo uspešnost kultivacije v novejšem času pripisemo tudi izpopolnjevanju metod in gojišč.

Od 282 vzorcev z osamljeno bakterijo *M. pneumoniae*, ki smo jih tipizirali, so v 49 % primerov bakterijo izolirali iz vzorcev bolnic, tako da je razporeditev vzorcev po spolu precej enakomerna. Opazili smo spremembo razmerja spolov po starostnih skupnah, saj je pri odraslih prevladoval delež okuženih žensk, pri otrocih pa je bilo več okuženih moškega spola. Sklepamo lahko, da je prišlo do spremembe razmerja spolov zaradi okužb znotraj družin (Dorigo-Zetsma in sod., 2001b), saj pogosto mati skrbi za bolnega otroka in je s tem bakteriji izpostavljen večje število odraslih žensk kot moških.

Za bakterijo *M. pneumoniae* je značilno, da povzroča okužbe predvsem pri mlajših otrocih in mladostnikih ter starejših (Hammerschlag, 2001; Waites in Talkington, 2004; Foy, 1993). Na podlagi zbranih podatkov lahko to trditev potrdimo tudi za okužbe v Sloveniji med letoma 2006 in 2013, saj je bilo 72,34 % okuženih oseb mlajših od 15 let. Največ okužb smo dokazali pri otrocih starih od 5 do 9 let. V naši analizi nismo uspeli potrditi, da bakterija

okužuje tudi starejše, saj smo imeli le dva izolata bakterije *M. pneumoniae* iz bolnikov starejših od 60 let.

Tudi v ZDA so tipizirali izolate *M. pneumoniae* zbrane med letoma 2006 in 2013 in dokazali v 57 % vseh izolatov bakterijo *M. pneumoniae* tipa 1. Tip 1 je prevladoval ves čas od leta 2006 do leta 2013, ko se je izenačil s tipom 2 (Diaz in sod., 2015).

Raziskave iz Evrope kažejo na razvoj epidemije okužb z *M. pneumoniae* od jeseni 2009 pa vse do konca leta 2012. Najzgodnejši začetek epidemije naj bi bil v Franciji v letu 2009 (Eibcah in sod., 2012), in v Italiji začetek leta 2010, nato so se začele konec leta 2010 epidemije v Veliki Britaniji in na Švedskem, Finskem, ter Danskom (Chironna in sod., 2011; Chalker in sod., 2012; Gadsby in sod., 2012; Linde in sod., 2012; Ramussen in sod., 2012; Uldum in sod., 2012). V drugi polovici leta 2011 se je epidemija okužb z bakterijo *M. pneumoniae* začela širiti v severno Evropo, natančneje v Nemčijo in na Nizozemsko ter na Norveško (Dumke in sod., 2015; Lenglet in sod., 2012; Polkowska in sod., 2012; Blystad in sod., 2012; Jacobs in sod., 2015).

Epidemijo v Franciji leta 2010 sta enakovredno povzročila z oba tipa bakterije *M. pneumoniae* (Pereyre in sod., 2012). Chironna in sod. (2011) so uspeli tipizirati 40 sevov pridobljenih v mestu Bari na jugu Italije leta 2010. Kar 82,5 % sevov je bilo tip 1 bakterije *M. pneumoniae*. Med epidemijo mikoplazemske atipične pljučnice v Angliji in Walesu (leta 2011) so opazili rahlo prevlada bakterije *M. pneumoniae* tip 1 (Chalker in sod., 2012). Ravno tako je med epidemijo v Nemčiji več kot polovico primerov zunajbolnišničnih pljučnic povzročil tip 1 bakterije *M. pneumoniae* (Dumke in sod., 2015; Jacobs in sod., 2015).

Analiza sevov *M. pneumoniae* pridobljene leta 2010 v Pekingu je pokazala, da je bila v 34 kliničnih vzorcih prisotna bakterija *M. pneumoniae* tipa 1 in le v enem vzorcu bakterija tipa 2 (Tian in sod., 2010). Vzorci zbrani v Šanghaju na Kitajskem med letoma 2009 in 2011 so pripadali v 92,7 % bakterijam *M. pneumoniae* tipa 1 (Xiao in sod., 2014).

V Sydneyu so med letoma 2008 in 2012 zbrali 30 kliničnih vzorcev za tipizacijo bakterije *M. pneumoniae*. Polovica vzorcev je pripadala tipu 1, kar kaže na enakomerno porazdelitev obeh tipov bakterije *M. pneumoniae* v populaciji (Xue in sod., 2014).

Podatki v Sloveniji kažejo, da se je epidemija okužb z *M. pneumoniae* pričela jeseni 2009 in dosegla vrh v letu 2010, kar kaže na sočasnost z epidemijami v ostalih delih osrednje, zahodne in severne Evrope. V času epidemije smo opazili, da je bilo je število okužb največje v zimskih mesecih (dva vrhunca epidemije), a rahla povečanja so opazna tudi v poletnem času (junij, julij, avgust).

Rezultati genotipizacije so pokazali, da sta v Sloveniji prisotna obo tipa bakterije *M. pneumoniae*. Opazili smo, da je pred začetkom epidemije leta 2009 prevladoval tip 2 bakterije (61,54 %). Njegov delež se je med epidemijo nato še povečal. Več kot 75 % okužb med epidemijo je bilo okužb z bakterijo *M. pneumoniae* tipa 2. Po epidemiji se je povečal delež bakterije *M. pneumoniae* tip 1, dokler nista bila obo tipa bakterije *M. pneumoniae* med letoma 2012 in 2013 v enaki meri povzročitelja okužb.

Raziskovalci v drugih državah v času epidemije navajajo prevlado tipa 1 bakterije *M. pneumoniae* (Anglija, Wales, Italija, Nemčija, Kitajska, ZDA) ali enak delež obeh tipov (Francija), razen podatkov za Sydney, kjer je ravno tako kot pri nas prevladovala bakterija *M. pneumoniae* tip 2 (Chalker in sod., 2012; Chironna in sod., 2011; Diaz in sod., 2015; Dumke in sod., 2015; Pereyre in sod., 2012; Tian in sod., 2010; Xiao in sod., 2014; Xue in sod., 2014).

Zanimivo je, da smo v Sloveniji v letu 2013 opazili, da je kar 64,86 % okužb povzročila bakterija *M. pneumoniae* tip 1. S tem smo dokazali, da med letoma 2012 in 2013 prišlo do zamenjave prevladujočega tipa bakterije *M. pneumoniae* v Sloveniji.

Zamenjavo prevladujočega tipa bakterije *M. pneumoniae* nekateri raziskovalci (Sasaki in sod., 1996; Waites in Talkington, 2004; Kenri in sod., 2008) povezujejo s pojavom nove epidemije. Morda je povečano število okužb z bakterijo *M. pneumoniae*, ki smo ga zaznali v letu 2013, tudi pri nas nakazovalo na pojav nove epidemije, ki je bila ugotovljena v letih 2014 in 2015.

Pri petih vzorcih nam genotipizacija ni uspela, zato smo jih ponovno kultivirali. Ker po 21 dneh v tekočem gojišču ni prišlo do spremembe barve pH indikatorja, lahko sklepamo, da se *M. pneumoniae* ni pomnožila. Zaključimo lahko, da obstaja verjetnost, da v teh shranjenih kulturnah ni bila prisotna mikoplazma ali pa je bakterija propadla zaradi zamrzovanja in odtajanja. Pri 15 vzorcih nam genotipizacija ni uspela le z genom MPN528a. Na podlagi rezultatov elektroforez produkta PCR tega gena, lahko sklepamo, da genotipizacija ni uspela zaradi premajhne količine produkta.

Pri treh vzorcih smo dokazali prisotnosti obeh tipov bakterije *M. pneumoniae*, kar smo potrdili s pirosekvenciranjem obeh genov. Prisotnost obeh tipov bakterije lahko pojasnimo z možno kontaminacijo vzorca ali pa je pri bolniku prišlo do sočasne okužbe, tako z bakterijo *M. pneumoniae* tip 1 kot z bakterijo *M. pneumoniae* tip 2.

Genotipizacija bakterije *M. pneumoniae* je vsekakor pomembna, saj se nakazuje povezava med zamenjavo prevladujočega tipa bakterije *M. pneumoniae*, ki kroži v populaciji, in in možnim razvojem nove epidemije. Povečano število pozitivnih vzorcev na približno vsaka 4 leta lahko nakazuje bližajočo se epidemijo, ki jo lahko dodatno napovedo še spremembe

na podlagi genotipa bakterije, ki povzroča večino okužb. Mislimo, da bi takšna predvidevanja lahko imela pozitiven učinek na javno zdravstvo, saj bi lahko predčasno začeli z informiranjem javnosti o primerni higieni kašlja in o zgodnjem prepoznavanju okužb. Raziskovalci so namreč že opazili, da s primernim informiranjem javnosti lahko zmanjšajo število okužb in trajanje izbruha (CDC, 2012).

6 SKLEPI

- Uspešnost kultivacije bakterije *M. pneumoniae* iz kužnin, ki so bile PCR pozitivne, je bila 52 % in je skozi leta nihala.
- Večina (72,34 %) bolnikov okuženih z bakterijo *M. pneumoniae* v Sloveniji so otroci in mladostniki, mlajši od 15 let.
- Delež okužb pri srednješolcih, starih 15 do 19 let, je zelo nizek (3,2 %).
- V Sloveniji je prišlo do epidemije z bakterijo *M. pneumoniae* med novembrom 2009 in koncem februarja 2011.
- Prevladajoč tip bakterije *M. pneumoniae* v Sloveniji pred epidemijo je bil tip 2.
- Med epidemijo od novembra 2009 do konca februarja 2011 je v Sloveniji več kot 70 % okužb povzročila bakterija *M. pneumoniae* tip 2.
- Po epidemiji, leta 2012, je v Sloveniji še opazna prevlada bakterije *M. pneumoniae* tip 2 (povzročil je 2/3 okužb).
- Leta 2013 se je v Sloveniji zgodila zamenjava tipov, prevladal je tip 1 bakterije *M. pneumoniae* (povzročil je 64,86 % okužb).

7 POVZETEK

Bakterija *M. pneumoniae*, ki jo uvrščamo v razred *Mollicutes*, je najmanjša bakterija zmožna samostojnega razmnoževanja. Je pomemben povzročitelj zunajbolnišničnih pljučnic pri otrocih med 5. in 15. letom starosti. Za patogenezo bakterije je pomembno pritrjevanje na epitelij dihal, za kar ima na površini več membranskih proteinov z visoko afiniteto za receptorje gostiteljskih celic. Eden najpomembnejših proteinov je adhezin P1. Ob mutacijah ali zdravljenju lahko bakterija izgubi protein P1, kar vodi v nezmožnost pritrjevanja in posledično izgubo virulentnosti. Raznolikost proteina P1 vodi k dvema različnima tipoma bakterije *M. pneumoniae*, tipu 1 in tipu 2.

Gen MPN141, ki kodira protein P1, vsebuje ponavljajoče se elemente RepMP2/3 in RepMP4, ki obstajajo v genomu v več kopijah. Posebna značilnost teh dveh elementov je polimorfizem mononukleotida. V sekvenci posameznega elementa je specifičen nukleotid, značilen posebej za tip 1 ali tip 2. Na mestu 184 991 v sekvenci genoma bakterije *M. pneumoniae* M129 ima tip 1 prisoten timin, tip 2 pa citozin. Drug gen, ki omogoča tipizacijo, je MPN528a, ki kodira homolog encimu RecU. Znotraj tega gena je ravno tako opažen polimorfizem posameznega nukleotida in sicer na mestu 650584, kjer ima tip 1 adenin, tip 2 pa citozin.

Za *M. pneumoniae* so značilne periodične epidemije na vsakih 3–7 let, ki trajajo do dve leti. Periodičnost epidemij naj bi bila posledica zamenjave dveh različnih tipov adhezina P1, ki je povezan s pritrjevanjem na celice epitelija. Zadnja epidemija v Evropi je bila leta 2010. V Sloveniji smo zasledili povečanje števila okužb z bakterijo *M. pneumoniae* med novembrom 2009 in koncem februarja 2011.

Večina metod za tipizacijo bakterije *M. pneumoniae* temelji na razlikah v genu za protein P1. V naši nalogi smo genotipizirali 282 izolatov bakterije *M. pneumoniae* zbranih med letoma 2006 in 2013 z metodo pirosekvensiranja, ki omogoča zaznavanje polimorfizma mononukleotida v genu MPN141 in genu MPN528a. Po izolaciji DNA in reakciji PCR smo uporabili produkt PCR z vezanim biotinom na 5' koncu, ga obdelali v enoverižno DNA in nato nanjo nalegali sekvenčni začetni oligonukleotid. Sledilo je sekvensiranje in analiza rezultatov.

Analiza rezultatov je pokazala, da je v času pred epidemijo v Sloveniji prevladoval tip 2, ki je bil na vrhuncu epidemije povzročitelj kar 80,95 % primerov okužb. V letu 2012 je njegov delež upadel in v letu 2013 je prišlo do zamenjave tipov. Podatki namreč kažejo, da je leta 2013 tip 1 povzročil več kot 2/3 pljučnic.

Epidemija okužb z *M. pneumoniae* v Sloveniji je sočasno potekala z epidemijami drugod po Evropi. Jeseni leta 2009 se je začela epidemija okužb z bakterijo *M. pneumoniae* v zahodni in osrednji Evropi, leto kasneje se je razširila proti severu Evrope in leta 2011 zajela še

skrajni sever (Švedska, Finska in Norveška). Sočasno so imeli epidemijo tudi na Kitajskem in v Avstraliji.

Študije genotipizacije izolatov *M. pneumoniae* kažejo, da je v Evropi in na Kitajskem med epidemijo prevladoval tip 1, v Franciji pa je bila epidemija povzročena enakomerno z obema tipoma. V Sloveniji je bil prevladajoč tip 2. Enako so v Avstraliji, v Sydneju, prevladovale okužbe s tipom 2.

V svetu je poznanih že več zamenjav tipov, še posebej dobro so to raziskali na Japonskem. Študije kažejo na možnost pojava epidemije ob zamenjavi tipov. Ali bo epidemija sledila zamenjavi tipov tudi v Sloveniji bodo pokazale nadaljne tipizacije v letih 2014 in 2015.

8 VIRI

Ahmadian A., Ehn M., Hober S. 2006. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta*, 363, 1-2: 83-94

Atkinson T. P., Balish M. F., Waites K. B. 2008. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiology Reviews*, 31: 956-973

Atkinson T. P., Waites K. B. 2014. *Mycoplasma pneumoniae* infections in childhood. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 33, 1: 92-94

Bai X., Zhang J., Ewing A., Miller S. A., Radek A. J., Shevchenko D. V., Tsukerman K., Walunas T., Lapidus A., Campbell J. W., Hogenhout S. A. 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188: 3682–3696

Balish M. F., Krause D. C. 2002. Cytadherence and the cytoskeleton. V: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Razin S., Herrmann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 491-518

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

Bébéar C. M., Bébéar C. 2002. Antimycoplasmal agents. V: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Razin S., Herrmann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 545-566

Bébéar C. M., Kempf I. 2005. Antimicrobial therapy and antimicrobial resistance. V: Mycoplasmas: molecular biology, pathogenicity and strategies for control. Blanchard A., Browning G. (eds.). Norfolk, Horizon Bioscience: 535–568

Bébéar C., Pereyre S., Peuchant O. 2011. *Mycoplasma pneumoniae*: susceptibility and resistance to antibiotics. *Future Microbiology*, 6, 4: 423-431

Bertaccini A., Duduk B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 355-378

Blanchard A., Bébéar C. M. 2002. Mycoplasmas of humans. V: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Razin S., Herrmann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 45-71

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

Blystad H., Ånestad G., Vestreheim D. F., Madsen S., Rønning K. 2012. Increased incidence of *Mycoplasma pneumoniae* infection in Norway 2011. Euro Surveillance, 17, 6: pii=20074
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20074> (24. 4. 2014)

Bradbury J. M., Morrow C. J. 2008. Mycoplasma infections. V: Poultry diseases. 6th ed. Pattison M., McMullin P. F., Bradbury J. M., Alexander D. J. (eds.). Edinburgh, Elsevier: 220–234

Brown D. R., May M., Bradbury J. M., Balish M. F., Calcutt M. J., Glass J. I., Tasker S., Messick J. B., Johansson K.-E., Neimark H. 2010. Genus I. *Mycoplasma*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 4. 2nd ed. Krieg N. R., Staley J. T., Brown D. R., Hedlund B. P., Paster B. J., Ward N. L., Ludwig W., Whitman W. B. (eds.). New York, Springer: 575-613

Catrein I., Dumke R., Weiner J., Jacobs E., Herrmann R. 2004. Cross-complementation between the products of the genes P1 and ORF6 of *Mycoplasma pneumoniae* subtypes 1 and 2. Microbiology, 150: 3989-400

Catrein I., Hermann R. 2011. The proteome of *Mycoplasma pneumoniae*, a supposedly »simple« cell. Proteomics, 11: 3614-3632

CDC. 2012. *Mycoplasma pneumoniae* respiratory illness - two rural counties, West Virginia, 2011. Morbidity and Mortality Weekly Report, 61, 41: 834-838

Chalker V. J. 2005. Canine mycoplasmas. Research in Veterinary Science, 79: 1–8

Chalker V. J., Stockl T., Litt D., Birmingham A., Watson J., Fleming D. M., Harrison T. G. 2012. Increased detection of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children in England and Wales, October 2011 to January 2012. Euro Surveillance, 17, 6: pii=20081
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20081> (24. 4. 2014)

Chanock R. M., Dienes L., Eaton M. D., Edward D. G., Freundt E. A., Hayflick L., Hers J. F. P., Jensen K. E., Liu C., Marmion B. P., Mufson M. A., Smith P. F., Somerson N. L., Taylor-Robinson D. 1963. *Mycoplasma pneumoniae*: proposed nomenclature for atypical pneumonia organism (Eaton agent). Science 140, 3567: 662-662

Chironna M., Sallustio A., Esposito S., Perulli M., Chinellato I., Di Bari C., Quarto M., Cardinale F. 2011. Emergence of macrolide-resistant strains during an outbreak of

Mycoplasma pneumoniae infections in children. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 66: 734-737

Cousin-Allery A., Charron A., de Barbeyrac B., Fremy G., Skov Jensen J., Renaudin H., Bebear C. 2000. Molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* strains by PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. Application to French and Danish isolates. Epidemiology and Infection, 124: 103-111

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

Dandekar T., Huynen M., Regula J. T., Ueberle B., Zimmermann C. U., Andrade M. A., Doerks T., Sánchez-Pulido L., Snel B., Suyama M., Yuan Y.P., Herrmann R., Bork Peer. 2000. Re-annotating the *Mycoplasma pneumoniae* genome sequence: adding value, function and reading frames. Nucleic Acids Research, 28, 17: 3278-3288

Daxboeck F., Kircher K., Krause R., Heinzl H., Wenisch C., Stanek G. 2002. Effect of age on antibody titer to *Mycoplasma pneumoniae*. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 34: 577–579

Dégrange S., Cazanave C., Charron A., Renaudin H., Bébéar C., Bébéar C. M. 2009. Development of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae*. Journal of Clinical Microbiology, 47, 4: 914-923

Diaz M. H., Benitez A. J., Winchel J. M. 2015. Investigations of *Mycoplasma pneumoniae* infections in the United States: trends in molecular typing and macrolide resistance from 2006 to 2013. Journal of Clinical Microbiology, 53: 124-130

Dorigo-Zetsma J. W., Wilbrink B., Dankert J., Zaaij S. A. J. 2001a. *Mycoplasma pneumoniae* P1 Type 1- and Type 2-specific sequences within the P1 cytadhesin gene of individual strains. Infection and Immunity, 69, 9: 5612-5618

Dorigo-Zetsma J. W., Wilbrink B., van der Nat H., Barteld A. I. M., Heijnen M.-L. A., Dankert J. 2001b. Results of molecular detection of *Mycoplasma pneumoniae* among patients with acute respiratory infection and in their household contacts reveals children as Human reservoirs. Journal of Infectious Diseases, 183: 675-678

dos Santos A. P., dos Santos R. P., Biondo A. W., Dora J. M., Goldani L. Z., de Oliveira S. T., de Sa Guimaraes A. M., Timenetsky J., de Moraes H. A., Gonzalez F. H., Messick J. B. 2008. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. Emerging Infectious Diseases, 14: 1922–1924

- Dumke R., Lück P. C., Noppen C., Schaefer C., von Baum H., Marre R., Jacobs E. 2006. Culture-independent molecular subtyping of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 7: 2567-2570
- Dumke R., Schnee C., Pletz M. W., Rupp J., Jacobs E., Sachse K., Rohde G., CAPNETZ study group. 2015. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia* spp. infection in community-acquired pneumonia, Germany, 2011–2012. *Emerging Infectious Diseases*, 21, 3: 426-434
- Dutow P., Schmidl S. R., Ridderbusch M., Stülpke J. 2010. Interactions between glycolytic enzymes of *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 19: 134–139
- Eaton M. D., Meikejohn G., van Herick W. 1944. Studies on the etiology of primary atypical pneumonia: a filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters, and chick embryos. *Journal of Experimental Medicine*, 79: 649–667
- Eibach D., Casalegno J. S., Escuret V., Billaud G., Mekki Y., Frobert E., Bouscambert-Duchamp M., Lina B., Morfin F. 2012. Increased detection of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children, Lyon, France, 2010 to 2011. *Euro Surveillance*, 17, 8: pii=20094 <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20094> (24. 4. 2014)
- Foy H. M. 1993. Infections caused by *Mycoplasma pneumoniae* and possible carrier state in different populations of patients. *Clinical Infectious Diseases*, 17, Suppl. 1: S37-S46
- Frey J. 2002. Mycoplasmas of animals. V: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Razin S., Herrmann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 73-90
- Gadsby N. J., Reynolds A. J., McMenamin J., Gunson R. N., McDonagh S., Molyneaux P. J., Yirrell D. L., Templeton K. E. 2012. Increased reports of *Mycoplasma pneumoniae* from laboratories in Scotland in 2010 and 2011 – impact of the epidemic in infants. *Euro Surveillance*, 17, 10: pii=20110 <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20110> (24. 4. 2014)
- Gass R., Fisher J., Badesch D., Zamora M., Weinberg A., Melsness H., Grover F., Tully J. G., Fang F. C. 1996. Donor-to-host transmission of *Mycoplasma hominis* in lung allograft recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 22: 567–568
- Halbedel S., Hinnerk E., Beate J., Busse J., Hecker M., Engelmann S., Stülpke J. 2007. Transcription in *Mycoplasma pneumoniae*: analysis of the promoters of the *ackA* and *ldh* genes. *Journal of Molecular Biology*, 371: 596–607

Hammerschlag M. R. 2001. *Mycoplasma pneumoniae* infections. Current Opinion in Infectious Diseases, 14: 181-186

Hasselbring B. M., Jordan J. L., Krause R. W., Krause D. C. 2006. Terminal organelle development in the cell wall-less bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103: 16478–16483

Himmelreich R., Hilbert H., Plagens H., Pirkl E., Li B.-C., Herrmann R. 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. Nucleic Acids Research, 24, 22: 4420-4449

Hopkins P. M., Winlaw D. S., Chhajed P. N., Harkness J. L., Horton M. D., Keogh A. M., Malouf M. A., Glanville A. R. 2002. *Mycoplasma hominis* infection in heart and lung transplantation. Journal of Heart and Lung Transplantation, 21: 1225–1229

IRPCM. 2004. ‘*Candidatus Phytoplasma*’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonise plant phloem and insects. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 1243–1255

Jacobs E. 2002. *Mycoplasma pneumoniae* disease manifestations and epidemiology. V: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Razin S., Herrmann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 519-522

Jacobs E. 2012. *Mycoplasma pneumoniae*: now in the focus of clinicians and epidemiologists. Euro Surveillance, 17, 6: pii=20084
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20084> (24. 4. 2014)

Jacobs E., Ehrhardt I., Dumke R. 2015. New insights in the outbreak pattern of *Mycoplasma pneumoniae*. International Journal of Medical Microbiology, 305, 7: 705-708

Johansson K.-E., Pettersson B. 2002. Taxonomy of *Mollicutes*. V: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Razin S., Herrmann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 9-10

Kenny G. E., Cartwright F. D. 2001. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *M. pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to GAR-936, dalfopristin, dirithromycin, evernimicin, gatifloxacin, linezolid, moxifloxacin, quinupristin-dalfopristin, and telithromycin compared to their susceptibilities to reference macrolides, tetracyclines and fluoroquinolones. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45: 2604-2608

Kenri T., Okazaki N., Yamazaki T., Narita M., Izumikawa K., Matsuoka M., Suzuki S., Horino A., Sasaki T. 2008. Genotyping analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains in Japan between 1995 and 2005: type shift phenomenon of *M. pneumoniae* clinical strains. Journal of Medical Microbiology, 57: 469-475

Kenri T., Taniguchi R., Sasaki Y., Okazaki N., Narita M., Izumikawa K., Umetsu M., Sasaki T. 1999. Identification of a new variable sequence in the P1 cytadhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae*: evidence for the generation of antigenic variation by DNA recombination between repetitive sequences. *Infection and Immunity*, 67, 9: 4557-4562

Keše D., Lorenčič Robnik S., Gorišek Miksić N., Kogoj R., Košir G. 2014. Urogenitalne mikoplazme pregledno in prikaz primera izvengenitalne okužbe z bakterijo *Mycoplasma hominis*. V: Okužbe spolovil in spolno prenosljive bolezni: [zbornik predavanj]. 6. Baničevi dnevi. Petrovec M., Golle A (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 83-92

Lenglet A., Herrador Z., Magiorakos A. P., Leitmeyer K., Coulombier D., European Working Group on *Mycoplasma pneumoniae* surveillance. 2012. Surveillance status and recent data for *Mycoplasma pneumoniae* infections in the European Union and European Economic Area, January 2012. *Euro Surveillance*, 17, 5: pii=20075
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20075> (24. 4. 2014)

Lind K., Benzon M. W., Skov Jensen J., Clyde W. A. Jr. 1997. A seroepidemiological study of *Mycoplasma pneumoniae* infections in denmark over the 50-year period 1946-1995. *European Journal of Epidemiology*, 13: 581-586

Linde A., Ternhag A., Törner A., Claesson B. E. 2012. Antibiotic prescriptions and laboratory-confirmed cases of *Mycoplasma pneumoniae* during the epidemic in Sweden in 2011. *Euro Surveillance*, 17, 6: pii=20082
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20082> (24. 4. 2014)

Lo S. C., Wear D. J., Green S. L., Jones P. G., Legier J. F. 1993. Adult respiratory distress syndrome with or without systemic disease associated with infections due to *Mycoplasma fermentans*. *Clinical Infectious Diseases*, 17, Suppl. 1: S259-S263

Lucier T. S., Heitzman K., Liu S. K., Hu P. C. 1995. Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 12: 2770–2773

Maggi R. G., Compton S. M., Trull C. L., Mascarelli P. E., Mozayeni B. R., Breitschwerdt E. B. 2013. Infection with hemotropic *Mycoplasma* species in patients with or without extensive arthropod or animal contact. *Journal of Clinical Microbiology*, 51: 3237–3241

Manso-Silvan L., Vilei E. M., Sachse K., Djordjevic S. P., Thiaucourt F., Frey J. 2009. *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. *bovine* group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *Capri*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 1353–1358

Martínez M., Ruiz M., Zunino E., Luchsinger V., Aguirres R., Avendaño L. F. 2010.
Identification of P1 types and variants of *Mycoplasma pneumoniae* during an epidemic
in Chile. *Journal of Medical Microbiology*, 59: 925-929

Miles R. J. 1992. Catabolism in *Mollicutes*. *Journal of General Microbiology*, 138: 1773–
1783

Mušič E., Osolnik K., Tomič V., Eržen R., Košnik M., Beović B., Lejko-Zupanc T., Strle
F., Vodopivec-Jamšek V., Živčec-Kalan G., Švab I., Sočan M. 2010. Priporočila za
obravnavo zunajbolnišnične pljučnice odraslih (prenovljena in dopolnjena izdaja,
2010). *Zdravniški vestnik*, 79: 245-264

Narita M. 2010. Pathogenesis of extrapulmonary manifestations of *Mycoplasma
pneumoniae* infection with special reference to pneumonia. *Journal of Infection and
Chemotherapy*, 16: 162-169

Pereyre S., Charron A., Hidalgo-Grass C., Touati A., Moses A. E., Nir-Paz R., Bébéar C.
2012. The spread of *Mycoplasma pneumoniae* is polyclonal in both an endemic setting
in France and in an epidemic setting in Israel. *PloS ONE*, 7, 6: e38585,
doi:10.1371/journal.pone.0038585: 9 str.

Pereyre S., Charron A., Renaudin H., Bébéar C., Bébéar C. M. 2007. First report of
macrolide-resistant strains and description of a novel nucleotide sequence variation in
the P1 adhesin gene in *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains isolated in France over
12 years. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 11: 3534-3539

Pereyre S., Gonzalez P., de Barbeyrac B., Darnige 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 in *M. hominis*. *Antimicrobial Agents and
Chemotherapy*, 46: 3142–3150

Polkowska A., Harjunpää A., Toikkanen S., Lappalainen M., Vuento R., Vuorinen T.,
Kauppinen J., Flinck H., Lyytikäinen O. 2012. Increased incidence of *Mycoplasma
pneumoniae* infection in Finland, 2010–2011. *Euro Surveillance*, 17, 5: pii=20072
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20072> (24. 4. 2014)

Potts J. M., Ward A. M., Rackley R. R. 2000. Association of chronic urinary symptoms in
women and *Ureaplasma urealyticum*. *Urology*, 55: 486-489

Qu J., Gu L., Wu J., Dong J., Pu Z., Gao Y., Hu M., Zhang Y., Gao F., Cao B., Wang C.
2013a. Accuracy of IgM antibody testing, FQ-PCR and culture in laboratory diagnosis
of acute infection by *Mycoplasma pneumoniae* in adults and adolescents with

- community-acquired pneumonia. BMC Infectious Diseases, 13: 172, doi: 10.1186/1471-2334-13-172: 6 str.
- Qu J., Yu X., Liu Y., Yin Y., Gu L., Cao B., Wang C. 2013b. Specific Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis genotypes of *Mycoplasma pneumoniae* are associated with diseases severity and macrolide susceptibility. PLoS ONE, 8, 12: e82174, doi: 10.1371/journal.pone.00821745: 5 str.
- Rasmussen J. N., Voldstedlund M., Andersen R. L., Ellermann-Eriksen S., Jensen T. G., Johansen H. K., Kolmos B., Mølvadgaard M., Nielsen S. S., Olsen E, Schønning K., Uldum S. A. 2010. Increased incidence of *Mycoplasma pneumoniae* infections detected by laboratory-based surveillance in Denmark in 2010. Euro Surveillance, 15, 45: pii=19708
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19708> (24. 4. 2014)
- Razin S. 1978. The mycoplasmas. Microbiological Reviews, 42, 2: 414-470
- Razin S. 1979. Isolation and characterization of *Mycoplasma* membranes. V: The mycoplasmas. Vol. 1. Barile M. F., Razin S. (eds.). New York, Academic Press: 213–229
- Razin S. 1983. Cell lysis and isolation of membranes. V: Methods in mycoplasmology. Vol. 1. Razin S., Tully J. G. (eds.). New York, Academic Press: 225–233
- Razin S. 1996. Mycoplasmas. V: Medical microbiology. 4th ed. Baron S. (ed.). Galveston, University of Texas Medical Branch at Galveston (NCBI Bookshelf: ID NBK7627): 8 str.
- Razin S. 2002. Diagnosis of mycoplasmal infections. V: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Razin S., Herrmann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 531–544
- Rechnitzer H., Rottem S., Herrmann R. 2013. Reconstitution of an active arginine deiminase pathway in *Mycoplasma pneumoniae* M129. Infection and Immunity, 81, 10: 3742–3749
- Robertson J. A., Taylor-Robinson D. 2010. Genus II. *Ureaplasma*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 4. 2nd ed. Krieg N. R., Staley J. T., Brown D. R., Hedlund B. P., Paster B. J., Ward N. L., Ludwig W., Whitman W. B. (eds.). New York, Springer: 613-618
- Rosenstein I. J., Morgan D. J., Sheehan M., Lamont R. F., Taylor-Robinson D. 1996. Bacterial vaginosis in pregnancy: distribution of bacterial species in different gram-stain categories of the vaginal flora. Journal of Medical Microbiology, 45: 120-126

- Ruland K., Wenzel R., Herrmann R. 1990. Analysis of three different repeated DNA elements present in the P1 operon of *Mycoplasma pneumoniae*: size, number and distribution on the genome. *Nucleic Acids Research*, 18, 21: 6311-6317
- Sánchez-Vargas F. M., Gómez-Duarte O. G. 2008. *Mycoplasma pneumoniae* - an emerging extra-pulmonary pathogen. *Clinical Microbiology and Infection*, 14: 105–115
- Saraya T., Kurai D., Nakagaki K., Sasaki Y., Niwa S., Tsukagoshi H., Nunokawa H., Ohkuma K., Tsujimoto N., Hirao S., Wada H., Ishii H., Nakata K., Kimura H., Kozawa K., Takizawa H., Goto H. 2014. Novel aspects on the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia and therapeutic implications. *Frontiers in Microbiology*, 5: 410, doi: 10.3389/fmicb.2014.00410: 18 str.
- Sasaki T., Kenri T., Okazaki N., Iseki M., Yamashita R., Shintani M., Sasaki Y., Yayoshi M. 1996. Epidemiological study of *Mycoplasma pneumoniae* infections in Japan based on PCR-restriction fragment length polymorphism of the P1 cytadhesin gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 2: 447-449
- Schwartz S. B., Mitchell S. L., Thurman K. A., Wolff B. J., Winchell J. M. 2009. Identification of P1 variants of *Mycoplasma pneumoniae* by use of high-resolution melt Aaalysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 12: 4117-4120
- Seemüller E., Schneider B. 2004. ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’, ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’ and ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’, the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1217–1226
- Seto S., Layh-Schmitt G., Kenri T., Miyata M. 2001. Visualization of the attachment organelle and cytadherence proteins of *Mycoplasma pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. *Journal of Bacteriology*, 183: 1621–1630
- Shahram M., Nicholas R. A., Wood A. P., Kelly D. P. 2010. Further evidence to justify reassignment of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* Large Colony type to *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri*. *Systematic and Applied Microbiology*, 33: 20–24
- Shimizu T., Kimura Y., Kida Y., Kuwano K., Tachibana M., Hashino M., Watarai M. 2014. Cytadherence of *Mycoplasma pneumoniae* induces inflammatory responses through autophagy and Toll-like receptor 4. *Infection and Immunity*, 82, 7: 3076–3086
- Simmons W. L., Daubenspeck J. M., Osborne J. D., Balish M. F., Waites K. B., Dybvig K. 2013. Type 1 and type 2 strains of *Mycoplasma pneumoniae* form different biofilms. *Microbiology*, 159: 737-747

Simmons W. L., Dybvig K. 2007. Biofilms protect *Mycoplasma pulmonis* cells from lytic effects of complement and gramicidin. *Infection and Immunity*, 75, 8: 3696-3699

Sluijter M., Kaptein E., Spuesens E. B. M., Hoogenboezem T., Hartwig N. G., van Rossum A. M. C., Vink C. 2010. The *Mycoplasma genitalium* MG352-encoded protein is a Holliday junction resolvase that has a non-functional orthologue in *Mycoplasma pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 77, 5: 1261-1277

Spuesens E. B. M., Hoogenboezem T., Sluijter M., Hartwig N. G., van Rossum A. M. C., Vink C. 2010. Macrolide resistance determination and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* by pyrosequencing. *Journal of Microbiological Methods*, 82: 214-222

Spuesens E. B. M., Oduber M., Hoogenboezem T., Sluijter M., Hartwig N. G., van Rossum A. M. C., Vink C. 2009. Sequence variations in RepMP2/3 and RepMP4 elements reveal intragenomic homologous DNA recombination events in *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiology*, 155: 2182-2196

Steer J. A., Tasker S., Barker E. N., Jensen J., Mitchell J., Stocki T., Chalker V. J., Hamon M. 2011. A novel hemotropic *Mycoplasma* (Hemoplasma) in a patient with hemolytic anemia and pyrexia. *Clinical Infectious Diseases*, 53: 147–151

Su C. J., Chavoya A., Dallo S. F., Baseman J. B. 1990. Sequence divergency of the cytadhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 58, 8: 2669-2674

Sykes J. E., Tasker S. 2014. Hemoplasma infections. V: Canine and feline infectious diseases. Sykes J. E. (ed.). Saint Louis, W.B. Saunders: 390-398

Talkington D. F., Thacker W. L., Keller D. W., Jensen J. S. 1998. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection in autopsy and open-lung biopsy tissues by nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 1151–1153

Talkington D. F., Shott S., Fallon M. T., Schwartz S. B., Thacker W. L. 2004. Analysis of eight commercial enzyme immunoassay tests for detection of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in human serum. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11, 5: 862-867

Taylor-Robinson, D. 1996. Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: an update. *Clinical Infectious Diseases*, 23: 671-684

Tehnološka navodila za integrirano pridelavo sadja. 2014. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo in okolje RS: 8-8, 18-18, 24-24
http://www.mkgp.gov.si/si/delovna_podrocja/kmetijstvo/integrirana_pridelava/tehnolo_ska_navodila/ (17. 8. 2015)

Tian X.-J., Dong Y.-G., Dong X.-P., Li J.-Y., Li D., Jiang Y., Xin D.-L. 2013. P1 gene of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical isolates collected in Beijing in 2010 and relationship between genotyping and macrolide resistance. Chinese Medical Journal, 126, 20: 3944-3948

Tully J. G., Rose D. L., Whitcomb R. F., Wenzel R. P. 1979. Enhanced isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from throat washings with a newly modified culture medium. Journal of Infectious Diseases, 139, 4: 478-482

Uldum S. A., Bangsborg J. M., Gahrn-Hansen B., Ljung R., Mølvadgaard M., Føns Petersen R., Wiid Svarrer C. 2012. Epidemic of *Mycoplasma pneumoniae* infection in Denmark, 2010 and 2011. Euro Surveillance, 17, 5: pii=20073
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20073> (24. 4. 2014)

Ursi D., Ieven M., van Bever H., Quint W., Niesters H. G. M., Goossens H. 1994. Typing of *Mycoplasma pneumoniae* by PCR-mediated DNA fingerprinting. Journal of Clinical Microbiology, 32, 11: 2873-2875

Waites K. B. 2003. New concepts of *Mycoplasma pneumoniae* infections in children. Pediatric Pulmonology, 36: 267–278

Waites K. B., Balish M. F., Atkinson T. P. 2008. New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. Future Microbiology, 3, 6: 635-648

Waites K. B., Crabb D. M., Bing X., Duffy L. B. 2003. *In vitro* susceptibilities to and bactericidal activities of garenoxacin (BMS-284756) and other antimicrobial agents against human mycoplasmas and ureaplasmas. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 47, 1: 161–165

Waites K. B., Talkington D. F. 2004. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clinical Microbiology Reviews, 17, 4: 697-728

Waites K. B., Talkington D. 2005. New developments in human disease due to Mycoplasmas. V: Mycoplasmas: molecular biology, pathogenicity, and strategies for control. Blanchard A., Browning G. (eds.). Norfolk, Horizon Bioscience: 289–354

Waites K. B., Xiao L., Paralanov V., Viscardi R. M., Glass J. I. 2012. Molecular methods for the detection of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* infections in humans. Journal of Molecular Diagnostics, 14, 15: 437-450

Waldo R. H., Krause D. C. 2006. Synthesis, stability, and function of cytadhesin P1 and accessory protein B/CC of *Mycoplasma pneumoniae*. Journal of Bacteriology, 188, 2: 569-575

Wodke J. A., Alibés A., Cozzuto L., Hermoso A., Yus E., Lluch-Senar M., Serrano L., Roma G. 2015. MyMpn: a database for the systems biology model organism *Mycoplasma pneumoniae*. Nucleic Acids Research, 43: D618-D623

Xiao J., Liu Y., Wand M., Jiang C., You X., Zhu C. 2014. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* P1 subtype variations by denaturing gradient gel electrophoresis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 78: 24-28

Xue G., Wang Q., Yan C., Jeoffreys N., Wang L., Li S., Gilbert G. L., Sun H. 2014. Molecular characterizations of PCR-positive *Mycoplasma pneumoniae* specimens collected from Australia and China. Journal of Medical Microbiology, 52, 5: 1478-1482

Zhao F., Cao B., Li J., Song S., Tao X., Yin Y., He L., Zhang J. 2011. Sequence analysis of the P1 adhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical isolates collected in Beijing in 2008 to 2009. Journal of Clinical Microbiology, 49, 8: 3000-3003

Značilnosti trsnih rumenic. 2009. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Fitosanitarna uprava RS: 1-5
http://www.furs.si/svn/zvr/POSNadzori/Rumenice/RumenicePosObv/FDseznam_dec2009/letak_znacilnosti_trsnih%20rumenic.pdf (6. 9. 2015)

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila mentorici prof. dr. Darji Keše za vso prijaznost, pomoč pri delu in pisanju ter za strokovne nasvete, ki so mi lajšali pot do magistrskega dela. Iskrena zahvala gre tudi recenzentki prof. dr. Darji Žgur-Bertok za hiter in natančen pregled magistrske naloge.

Posebno zahvalo moram izreči tudi Roku Kogoju za izredno potrpežljivost, razumevanje, pozitivno energijo in pomoč v laboratoriju. Hvala tudi Sabini in Ines ter ostalim na IMI, ki so mi pomagali in popestrili mnoge delovne dni.

Zahvala gre še fantu Roku in moji družini za vso zaupanje vame. Z mano in mojo navdušenostjo ste vztrajali od prvega dne študija.

Nikakor pa ne smem pozabiti na Katarino in ostale prijateljice, s katerimi smo si delile smeh in lepe trenutke študija pa tudi nudile oporo kadar ni bilo vse enostavno.