

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Průkaz *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*
sety MYCOPLASMA SYSTEM Plus**

Bc. Andrea Benedíková

Diplomová práce

2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Andrea BENEDÍKOVÁ**

Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**

Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

Název tématu: **Průkaz Mycoplasma hominis a Ureaplasma urealyticum
sety MYCOPLASMA SYSTEM Plus**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracování literární rešerše se zaměřením na výskyt a průkaz Mycoplasma hominis a Ureaplasma urealyticum.
2. Vyšetření vzorků určených k průkazu Mycoplasma hominis a Ureaplasma urealyticum komerčně dodávanými sety MYCOPLASMA SYSTEM Plus.
3. Současný průkaz Mycoplasma hominis a Ureaplasma urealyticum ve stejných vzorcích kultivačními metodami.
4. Vyhodnocení nálezů Mycoplasma hominis a Ureaplasma urealyticum ve vztahu ke klinickému nálezu, anamnestickým údajům, věku a antikoncepci.
5. Porovnání výsledků s publikovanými poznatky.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

podle pokynu vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Markéta Vydržalová, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce:

MUDr. Dagmar Malotová


Nemocnice Šternberk

Datum zadání diplomové práce:

1. října 2008

Termín odevzdání diplomové práce:

7. května 2009


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2009

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4.5.2009

Andrea Benedíková

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala Mgr. Markétě Vydržalové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce a cenné rady při jejím zpracování.

Ráda bych také poděkovala prim. MUDr. Dagmar Malotové, MVDr. Michaele Ziklové a všem ostatním pracovníkům Laboratoře klinické mikrobiologie s.r.o. Šternberk za ochotu spolupracovat a obětavou pomoc v laboratoři.

SOUHRN

Diplomová práce je zaměřena na průkaz a výskyt *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* v urogenitálním traktu mužů a žen.

Celkem bylo vyšetřeno 102 vzorků. Z uvedeného počtu bylo 5 (4,9 %) vzorků s pozitivním kultivačním nálezem na *Mycoplasma hominis* a 41 (40,2 %) na *Ureaplasma urealyticum*.

Výsledky byly porovnány s výsledky komerčního setu MYCOPLASMA SYSTEM Plus a hodnoceny ve vztahu k pohlaví, věku, diagnóze a používané antikoncepci u žen.

Při průkazu *Mycoplasma hominis* podalo vyšetření kultivační metodou a komerčním setem shodné výsledky u 96 (94,1 %) vzorků. Z toho 93 (96,9 %) vzorků bylo negativních a 3 (3,1 %) vzorky pozitivní na přítomnost *Mycoplasma hominis*. Výsledek setu a kultivační metody se lišil u 6 (5,9 %) vzorků. Výsledky průkazu *Ureaplasma urealyticum* kultivační metodou a komerčním setem se shodovaly u 87 (85,3 %) vzorků. Z toho 60 (69 %) vzorků bylo negativních a 27 (31 %) pozitivních na přítomnost *Ureaplasma urealyticum*. Rozdílný výsledek mezi kultivací a setem se vyskytl u 15 (14,7 %) vzorků.

Z celkového počtu 102 vyšetřených vzorků bylo 77 (75,5 %) vzorků získáno stěrem z děložního krčku žen a 25 (24,5 %) vzorků výtěrem uretry mužů. *Mycoplasma hominis* bylo diagnostikováno u 2,6 % žen a 12 % mužů. Přítomnost *Ureaplasma urealyticum* byla prokázána u 46,8 % žen a 20 % mužů.

Dle věku byli pacienti rozděleni do 5 kategorií. Výskyt *Mycoplasma hominis* u žen byl zaznamenán pouze ve věkové kategorii 17 – 20 let (22,2 %). *Ureaplasma urealyticum* bylo s nejvyšší frekvencí (77,8 %) izolováno ve stejné věkové kategorii žen. U mužů byl nejvyšší výskyt obou mikroorganismů pozorován ve věkové kategorii 31 – 40 let (*Mycoplasma hominis* ve 20 %, *Ureaplasma urealyticum* ve 40 %).

Ve vztahu k diagnóze byla nejvyšší frekvence výskytu *Mycoplasma hominis* (25 %) zaznamenána u žen s prekancerózami (v této skupině byly ale vyšetřeny pouze 4 pacientky), *Ureaplasma urealyticum* (54,2 %) u žen se zánětlivými změnami pohlavní a močové soustavy. U mužů byl pozorován nejvyšší výskyt *Mycoplasma hominis* (100 %) i *Ureaplasma urealyticum* (100 %) u mužů s ostatními klinickými symptomy. Do této skupiny byl však zařazen pouze 1 pacient. U mužů se zánětlivými změnami pohlavní a

močové soustavy se *Mycoplasma hominis* vyskytovalo v 8,3 % a *Ureaplasma urealyticum* v 16,7 %.

Při studiu výskytu *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* ve vztahu k používané antikoncepci žen bylo *Mycoplasma hominis* izolováno pouze u žen, které užívaly hormonální antikoncepci a to v 5,3 %. Nejvyšší frekvence výskytu *Ureaplasma urealyticum* byla u žen po hysterektomii (100 %). Jedná se ale o skupinu pouze se 2 pacientkami. U žen užívajících hormonální antikoncepci se *Ureaplasma urealyticum* vyskytovalo v 55,3 %, u žen s nitroděložním tělískem v 50 % a u žen bez antikoncepce v 37,9 %.

klíčová slova: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, komerční set, kultivační metoda.

SUMMARY

The thesis deals with the demonstration and occurrence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in urogenital tract of males and females.

A total of 102 specimens were examined. From this number 5 (4,9 %) specimens were *Mycoplasma hominis* culture-positive and 41 (40,2 %) *Ureaplasma urealyticum* culture-positive.

The study results were compared with the results obtained by commercial set MYCOPLASMA SYSTEM Plus and were evaluated in relation to the patients' sex, age, diagnosis and used contraception by females.

In demonstration of *Mycoplasma hominis* culture method and commercial set reported identical results in 96 (94,1 %) specimens. From that 93 (96,9 %) specimens were negative and 3 (3,1 %) specimens were positive for *Mycoplasma hominis*. The result of culture method and set differed in 6 (5,9 %) specimens. The results of demonstration of *Ureaplasma urealyticum* by culture method and commercial set corresponded in 87 (85,3 %) specimens. From that 60 (69 %) specimens were negative and 27 (31 %) specimens were positive for *Ureaplasma urealyticum*. The different result between culture method and set was found in 15 (14,7 %) specimens.

From total of 102 examined specimens 77 (75,5 %) specimens were obtained by smear of uterine cervical of females and 25 (24,5 %) specimens by urethral swab of males. *Mycoplasma hominis* was detected in 2,6 % of females and in 12 % of males. Present of *Ureaplasma urealyticum* was demonstrated in 46,8 % of females and in 20 % of males.

Patients were divided into 5 age groups. The occurrence of *Mycoplasma hominis* in females was registered only in women aged between 17 and 20 years (22,2 %). *Ureaplasma urealyticum* was most frequently (77,8 %) isolated in the same age group of women. The highest occurrence of both microorganisms in men was detected in the age group between 31 and 40 years (*Mycoplasma hominis* in 20 %, *Ureaplasma urealyticum* in 40 %).

From the diagnosis point of view, the highest occurrence of *Mycoplasma hominis* (25 %) was registered in women with symptoms of precancerosis (but only 4 patients were examined in this group), *Ureaplasma urealyticum* (54,2 %) in women with inflammatory changes of genital and urinary tract. The highest occurrence of

Mycoplasma hominis (100 %) and also *Ureaplasma urealyticum* (100 %) was detected in men with other clinical symptoms. But only 1 patient was included into this group. In the group of men with inflammatory changes of genital and urinary tract *Mycoplasma hominis* was found in 8,3 % and *Ureaplasma urealyticum* in 16,7 %.

In the study of occurrence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in relation to the used contraception of women *Mycoplasma hominis* was isolated only in women who used hormonal contraception and it was in 5,3 %. The highest frequency of occurrence of *Ureaplasma urealyticum* was in women after hysterectomy (100 %). But there were only 2 patients in this group. In women used hormonal contraception was *Ureaplasma urealyticum* found in 55,3 %, in women with intrauterine device in 50 % and in women without any contraception in 37,9 %.

Keywords: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, commercial set, culture method.

SEZNAM ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
CO₂	oxid uhličitý
CR(E)ST syndrom	varianta systémové sklerodermie s častým výskytem anticentromerových protilátek (Calcinosis, Raynaud, Esofagus, Sklerodaktylie, Teleangiektazie)
č. š.	číslo šarže
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	test enzymové imunoanalýzy (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay)
HCl	kyselina chlorovodíková
HIV	virus lidského imunodeficitu (Human Immunodeficiency Virus)
IHT	test inhibice hemaglutinace
KBBV	Katedra biologických a biochemických věd
LKM	Laboratoř klinické mikrobiologie
M.	<i>Mycoplasma</i>
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MIT	metabolismus inhibiční test
MnSO₄	síran manganatý
Na₂CO₃	uhličitan sodný
NaOH	hydroxid sodný
NS	nespecifikováno
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PID	zánětlivé onemocnění pánve (Pelvic Inflammatory Disease)
PPLO	pleuropneumonii podobné organismy (Pleuro-Pneumonia-Like Organisms)
RIA	test radioimunoanalýzy (Radio-Imunno-Assay)
RIT	růstově inhibiční test
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
SLE	systémový lupus erythematosus (Systemic Lupus Erythematosus)
spp.	species (druh)

ssp. subspecies (poddruh)
tRNA transferová ribonukleová kyselina
U. *Ureaplasma*

OBSAH

1. ÚVOD	13
2. TEORETICKÁ ČÁST	14
2.1 Historie	14
2.2 Taxonomie	14
2.3 Vlastnosti mykoplazmat	15
2.3.1 Morfologie a struktura	15
2.3.2 Dělení mykoplazmat	17
2.3.3 Genetická výbava	18
2.3.4 Antigenní struktura a faktory patogenity	18
2.3.5 Biochemické vlastnosti	19
2.4 Výskyt a klinický význam mykoplazmat	20
2.4.1 Výskyt <i>Mycoplasma hominis</i>	21
2.4.1.1 Urogenitální infekce	21
2.4.1.2 Extragenitální infekce	22
2.4.2 Výskyt <i>Ureaplasma urealyticum</i>	23
2.4.2.1 Urogenitální infekce	23
2.4.2.2 Extragenitální infekce	25
2.5 Citlivost mykoplazmat	25
2.5.1 Citlivost na antibiotika	25
2.5.2 Testování citlivosti na antibiotika	27
2.5.2.1 Bujónová diluční metoda	27
2.5.2.2 Agarové techniky	28
2.5.3 Citlivost k vnějším podmínkám a chemickým látkám	28
2.6 Průkaz mykoplazmat	29
2.6.1 Vyšetřovaný materiál	29
2.6.2 Kultivace mykoplazmat	29
2.6.2.1 Kultivační média	29
2.6.2.2 Inkubační podmínky	30
2.6.2.3 Růst v tekutých půdách	30
2.6.2.4 Růst na agarových půdách	31
2.6.2.5 Kultivační systémy pro rychlou diagnostiku mykoplazmat	31

2.6.3 Identifikace mykoplazmat	33
2.6.3.1 Barvení kolonií mykoplazmat.....	33
2.6.3.2 Biochemické testy.....	33
2.6.3.3 Sérologická identifikace	33
2.6.3.4 Molekulárně biologické metody	34
2.6.4 Nepřímá diagnostika mykoplazmových infekcí	34
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
3.1 Materiál a metody.....	35
3.1.1 Vyšetřovaný materiál.....	35
3.1.2 Kultivační média.....	35
3.1.2.1 Příprava médií.....	35
3.1.2.2 Příprava jednotlivých složek médií	37
3.1.3 Komerční set MYCOPLASMA SYSTEM Plus.....	38
3.1.4 Média pro zjišťování kontaminace	39
3.1.5 Přístroje a pomůcky	39
3.1.5.1 Přístroje.....	39
3.1.5.2 Pomůcky	39
3.2 Pracovní postup	39
3.2.1 Odběr vzorků	39
3.2.2 Kultivace v PPLO bujónu.....	40
3.2.3 Kultivace na PPLO agaru	40
3.2.4 Komerční set MYCOPLASMA SYSTEM Plus.....	40
3.2.5 Zjišťování kontaminace	41
4. VÝSLEDKY	42
4.1 Růst mykoplazmat a ureaplazmat v PPLO bujónu	42
4.2 Růst mykoplazmat a ureaplazmat na PPLO agaru	42
4.3 Vyhodnocení setu MYCOPLASMA SYSTEM Plus.....	42
4.4 Vliv zjištěné kontaminace	43
4.5 Výsledky vyšetření	43
5. DISKUZE A ZÁVĚR	51
6. PŘÍLOHY.....	58
7. SEZNAM LITERATURY	61

1. ÚVOD

Mykoplazmata jsou nejmenší samostatně se replikující prokaryota schopná žít na bezbuněčných médiích. Postrádají genetickou výbavu pro tvorbu buněčné stěny, obsah cytoplasmy je ohraničen jen třívrstevnou cytoplazmatickou membránou. Rostou pomalu s generační dobou 1 až 6 hodin a tvoří malé kolonie (velikosti do 0,5 mm) typického vzhledu „sázeného vejce“. Kolonie ureaplazmat jsou menší, v průměru 10 až 50 µm.

Mykoplazmata jsou parazity lidí i zvířat. Jsou nejčastěji nacházena v dutině ústní, v horní části respiračního traktu a v urogenitálním traktu. Nejznámějšími mykoplazmaty způsobujícími onemocnění urogenitálního traktu jsou *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*. Jsou původci široké škály infekcí. Je prokázán jejich význam při bakteriální vaginóze, uretritidách, pyelonefritidách, epidydimitidách, salpingitidách, při komplikacích v těhotenství.

Klinický materiál se odebírá dle druhu onemocnění a metody stanovení mykoplazmat, vždy před léčbou antibiotiky. Pro průkaz *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* kultivační metodou jsou odebírány nejčastěji gynekologické vzorky, výtěry z uretry, moč a ejakulát. Materiál se odebírá do transportního (konzervačního) média, aby nevyschl, a zpracovává se co nejrychleji.

Tradiční kultivační technika pro detekci a identifikaci mykoplazmat je pracná, mikroorganismy mají vysoké růstové požadavky a jsou snadněji přerůstány jinými mikroorganismy. Ke zdokonalení detekce a identifikace mykoplazmat jsou vyvíjeny jiné metody jako polymerázová řetězová reakce (PCR). Nicméně není dosud dostupná žádná komerční nebo standardizovaná PCR metoda pro detekci mykoplazmat. Jako alternativní se jeví vývoj komerčních kultivačních kitů, které jsou jednoduché a rychlé.

Cílem této diplomové práce byl průkaz *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* souběžně konvenční kultivační metodou a komerčním setem MYCOPLASMA SYSTEM Plus. Získané výsledky byly porovnány a vyhodnoceny ve vztahu k pohlaví, věku, diagnóze a používané antikoncepci u žen.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Historie

Mykoplazmata jsou bakterie bez pevné buněčné stěny náležící do třídy *Mollicutes* (lat. mollis – měkký, cutis – kůže). Zástupci této třídy se pravděpodobně vyvinuli z gram-pozitivních bakterií blízkých klostridiím (Razin, 2003, Votava et al., 2003). Mnoho jejich vlastností, jako malá velikost genomu, nízký počet rRNA operonů a tRNA genů, nepřítomnost buněčné stěny, růstová náročnost a omezená metabolická aktivita, jsou výsledkem evoluce (Cunha et al., 1998, McAuliffe et al., 2006).

I když je název *Mycoplasma* pojmenováním konkrétního rodu, používá se termín mykoplazmata k označení všech zástupců třídy *Mollicutes*. První mykoplazma, *Mycoplasma mycoides ssp. mycoides*, bylo izolováno před koncem 19. století z dobytčat nemocných pleuropneumonií. Obecně byla mykoplazmata označována jako PPLO (pleuropneumonia-like organisms). Název mykoplazma byl mnohem později odvozen od morfologie bakteriálních buněk, která je pro některé druhy těchto mikrobů charakteristická (Parker a Duerden, 1993, Taylor-Robinson, 1999).

Mykoplazmata byla dlouhou dobu pokládána za patogeny a komensály pouze zvířecích hostitelů. Po objevu původce bovinní pleuropneumonie byly tyto mikroorganismy nalezeny i u ovcí, koz, hlodavců, psů a drůbeže. Průlomovým v názorech o hostitelském vztahu mykoplazmat byl ve 40. letech 20. století jejich nález ve spodní části genitálního traktu žen (Tully, 1996).

2.2 Taxonomie

Mykoplazmata jsou nejmenší samostatně se replikující prokaryota. Otázkou je, zda se jedná o primitivní bakterie reprezentující vývoj před vznikem peptidoglykanové stěny nebo zda prošly redukčním evolučním vývojem, kdy došlo ke ztrátě buněčné stěny. Výsledky molekulárních výzkumů založených převážně na sekvenaci ribozomální RNA (rRNA), obzvláště 16S rRNA, potvrzují hypotézu o redukční evoluci. Mykoplazmata tvoří fylogenetickou větev gram-pozitivních bakterií s nízkým

zastoupením guaninu a cytosinu a jsou úzce spjata se dvěma druhy klostridií, *Clostridium innocuum* a *Clostridium ramosum* (Razin, 2003, Woese et al., 1985).

Třída *Mollicutes* obsahuje 4 řády *Mycoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales* a *Entomoplasmatales*.

Řád *Mycoplasmatales* je představován jedinou čeledí - *Mycoplasmataceae*, do které se řadí 2 rody. Rod *Mycoplasma* obsahující 122 druhů a rod *Ureaplasma* pojmenovaný dle schopnosti utilizovat ureu a zahrnující dosud jen 7 druhů.

Zástupci řádu *Acholeplasmatales* nevyžadují k růstu cholesterol a patří do čeledi *Acholeplasmataceae* zahrnující jediný rod *Acholeplasma*, který má nyní nejméně 10 druhů.

Do řádu *Anaeroplasmatales* patří čeleď *Anaeroplasmataceae* s rody *Anaeroplasma* a *Asteroplasma*. Druhy *Anaeroplasma* jsou striktně anaerobní bakterie žijící v bachoru hovězího dobytka a ovcí.

Řád *Entomoplasmatales* zahrnuje dvě čeledi - *Entomoplasmataceae* a *Spiroplasmataceae*. Čeleď *Entomoplasmataceae* obsahuje dva rody - *Entomoplasma* a *Mesoplasma*. Čeleď *Spiroplasmataceae* obsahuje jediný rod *Spiroplasma*. Spiroplasmata jsou pohyblivá a jejich buňka má tvar spirály (Taylor-Robinson, 1999, http://vasatwiki.icrisat.org/index.php/Taxonomy_and_phylogeny_of_mycoplasma, 2009).

Quinn et al. (1994) zmiňují nezařazený saprofytický rod *Thermoplasma* nacházený v horkých kyselých vřídlech.

2.3 Vlastnosti mykoplazmat

2.3.1 Morfologie a struktura

Mykoplazmata jsou nejmenší organismy schopné samostatně se množit a žít na bezbuněčných médiích (Waites et al., 2005). Pro buňky mykoplazmat je charakteristický pleomorfismus a různá velikost. Základní formou je malé kokovité tělísko. Zralé kultury obsahují buňky větší, oválné, protáhlé, prstencovité a vláknité, někdy s větvením (odtud název: mykes – houba, plasma – tvar). Nejmenší jednotka mykoplazmat schopná reprodukce je přibližně kulovitá, o průměru 200 – 250 nm.

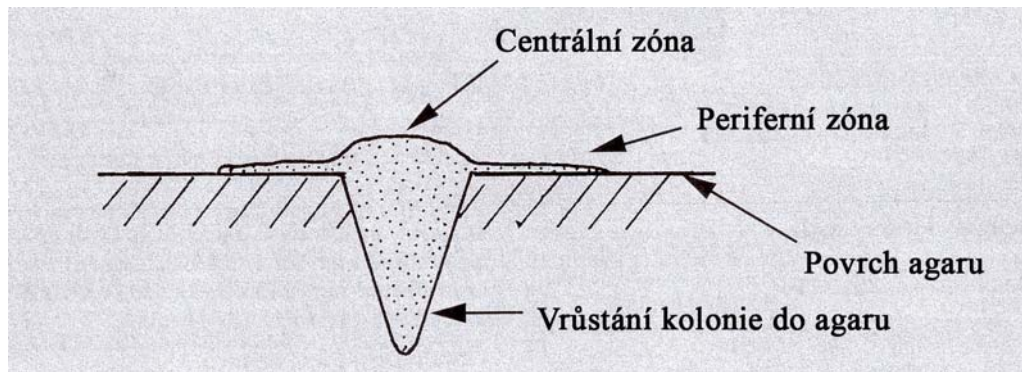
Z buněk této velikosti začíná kultura růst na umělých půdách. Buňky dorůstají do větších forem o průměru 0,5 – 1,0 μm , které tvoří základ charakteristických kolonií. Vlákňité formy mohou dosahovat délky až 100 μm a tloušťky 0,4 μm (Razin, 2003, Taylor-Robinson, 1999). Mnoho z nich je proto schopných projít bakteriálními filtry (Bednář et al., 1996, Murray et al., 1990).

Mykoplazmata postrádají genetickou výbavu pro tvorbu buněčné stěny (peptidoglykanu a některých dalších složek pevné buněčné stěny). Obsah cytoplasmy je ohraničen jen třívrstevnou cytoplazmatickou membránou složenou z proteinů, glykoproteinů, glykolipidů a fosfolipidů (Bednář et al., 1994, Quinn et al., 1994). Z těchto důvodů byla mykoplazmata dlouho považována za viry. Dělí se však binárním dělením typickým pro bakterie a jsou schopna růstu na umělých bezbuněčných médiích (Murray et al., 1990).

V elektronovém mikroskopu lze u některých druhů, včetně *Mycoplasma genitalium* a *Mycoplasma pneumoniae* izolovaných z člověka, pozorovat zvláštní struktury, tzv. P1 faktor, na jednom nebo obou koncích sloužící k přichycení na sliznici respiračního či genitálního traktu (Murray et al. 1990, Taylor-Robinson, 1999).

Většina mykoplazmat je fakultativně anaerobní, rostou na umělých bezbuněčných médiích a vyžadují exogenní steroly (kromě rodu *Acholeplasma*) (Parker a Duerden, 1993). Rostou pomalu s generační dobou 1 až 6 hodin a tvoří malé kolonie (velikosti do 0,5 mm) typického vzhledu „sázeného vejce“. Centrální tmavá část kolonie je konicky vrostlá do půdy, periferie je složena z transparentních elementů a roste na povrchu půdy (viz. Obr.1) (Bednář et al., 1994). Kolonie ureaplazmat (nazývané také T-druhy - T jako tiny, angl. droboučkový) jsou velmi malé, v průměru 10 až 50 μm (Murray et al., 1990). Obecně nezávisí velikost kolonií jen na druhu mykoplazmat, ale také na složkách a stupni hydratace média, na koncentraci agaru, na atmosférických podmínkách a na stáří kultury (Parker a Duerden, 1993). Kolonie je nutno pozorovat mikroskopicky.

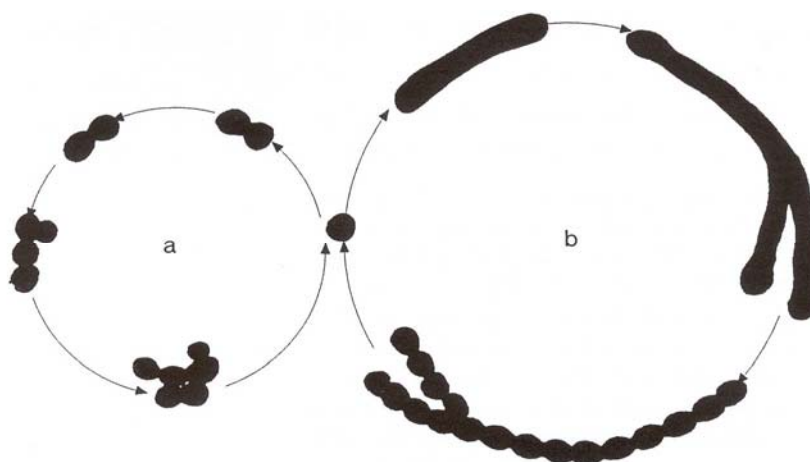
Obr. 1: Průřez kolonií mykoplazmat (Quinn et al., 1994)



2.3.2 Dělení mykoplazmat

Mykoplazmata se podobně jako ostatní bakterie množí binárním dělením, při kterém ale nemusí být dělení cytoplazmy synchronizováno s replikací jádra. Opožděným dělením cytoplazmy vznikají mnohojaderná vlákna a řetízky, která se mohou opět rozpadat na základní elementy. Tento replikační cyklus způsobující nápadnou pleomorfii mykoplazmat je podmíněn druhem organismu, ale i růstovou fází a zevními podmínkami (viz. Obr.2) (Bednář et al., 1994, Quinn et al., 1994, Taylor-Robinson, 1999).

Obr. 2: Rozmnožovací cyklus mykoplazmat: a) množení binárním dělením, b) tvorba mnohojaderných vláken a jejich rozpad na kokovitá tělíska (Bednář et al., 1996)



2.3.3 Genetická výbava

Mykoplazmata se vyznačují malou velikostí genomu. Velikost genomu rodů *Mycoplasma* a *Ureaplasma* je přibližně $5 \cdot 10^8$ daltonů (pro srovnání průměrná velikost bakteriálního genomu je $2,5 \cdot 10^9$ daltonů) (Quinn et al., 1994). Poměr guaninu (G) a cytosinu (C) je u většiny mykoplazmat velmi nízký (kolem 30) (Zahradnický et al., 1987). Mezi ostatními bakteriemi jsou podobně nízké hodnoty nacházeny pouze u některých klostridií, což může podpořit teorii o jejich fylogenetické příbuznosti (Parker a Duerden, 1993).

Mykoplazmata postrádají mnoho genů, včetně těch pro syntézu buněčné stěny a syntézu všech 20 aminokyselin, také geny kódující enzymy pro citrátový cyklus a většinu dalších biosyntetických genů (Razin et al., 1998).

2.3.4 Antigenní struktura a faktory patogenicity

Mykoplazmata se vyznačují fenotypovou a genotypovou rozmanitostí zejména povrchových antigenů. Genetická variabilita byla prokázána zejména u trojice povrchových proteinů P120, Lmp a Vaa (Ladefoged, 2000). Genově podmíněná antigenová variabilita je velmi komplikovaná a jejím zdrojem jsou pravděpodobně delece. Genová a fenotypová variabilita pomáhá mykoplazmatům přežít v lidském těle a chrání je před imunitním systémem hostitele (Melková, 2003, Soroka et al., 2001).

Antigeny *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* patří svojí povahou mezi proteinové, glykoproteinové a lipoproteinové komponenty buněčných struktur (Melková, 2003).

Melková (2003) potvrdila, že antigeny mykoplazmat stimuluji imunitní systém člověka a navozují tvorbu protilátek. Navíc zjistila, že *Mycoplasma* a *Ureaplasma* spp. se vyznačují vychytávací aktivitou pro komponenty vnějšího prostředí. V experimentálních modelech *in vitro* s použitím koňského séra se tato aktivita projevovala vazbou složek koňského séra. Buňky mykoplazmat s takto adheovanou komponentou poté stimulovaly imunitní odpověď u experimentálních zvířat a vyvolávaly tvorbu specifických protilátek. Tato adherence a následná stimulace imunitního systému by mohla vyvolávat také autoimunitní reakce.

2.3.5 Biochemické vlastnosti

Mykoplazmata využívají jako hlavní zdroj energie glukózu (a některé jiné sacharidy) nebo arginin. Některá využívají oba tyto substráty. Arginin, hlavní zdroj energie pro nefermentující mykoplazmata, je metabolizován systémem tří enzymů na amoniak, CO₂ a ATP. Pro ureaplazmata je charakteristická přeměna močoviny na amoniak pomocí ureázy, přičemž se generuje ATP. Tyto biochemické reakce se využívají v detekci, identifikaci a klasifikaci mykoplazmat (Taylor-Robinson, 1999).

Mycoplasma hominis je fakultativně anaerobní, metabolizuje arginin, ale ne glukózu. *Ureaplasma urealyticum* vyžaduje pro růst ureu, přičemž ale zvýšením pH spojeným s metabolismem urey svůj růst inhibuje. Média musí být proto mimo obsahu močoviny vysoce pufována. Přesto ale ureaplazmata rychle po původní izolaci hynou (Murray et al., 1990).

Přehled vybraných biochemických vlastností mykoplazmat způsobujících onemocnění člověka uvádí následující tabulka (Tabulka I).

Tabulka I: Vybrané biochemické vlastnosti mykoplazmat (Taylor-Robinson, 1999).

mykoplazma	metabolizuje	optimální pH půdy	aerobní redukce tetrazolia	fosfatáza	hemadsorpce (kuřecí erytrocyty)	citlivost k thaliu
<i>M. buccale</i>	arginin	7,0	-	+	-	-
<i>M. faucium</i>	arginin	7,0	-	-	+	-
<i>M. fermentans</i>	glukózu a arginin	7,5	-	+	-	-
<i>M. genitalium</i>	glukózu	7,5	S	-	+	+
<i>M. hominis</i>	arginin	7,0	-	-	-	+
<i>M. laidlawii</i>	glukózu	7,5	S	-	-	-
<i>M. lipophilum</i>	arginin	7,0	-	?	-	-
<i>M. orale</i>	arginin	7,0	-	-	+	-
<i>M. pneumoniae</i>	glukózu	7,5	+	-	+	-
<i>M. primatum</i>	arginin	7,0	-	+	-	-
<i>M. salivarium</i>	arginin	7,0	-	-	-	-
<i>M. spermatophilum</i>	arginin	7,0	-	S	-	-
<i>U. urealyticum</i>	ureu	≤ 6,0	-	+	+	+

S - slabá

* jen sérotyp 3

2.4 Výskyt a klinický význam mykoplazmat

Mykoplazmata jsou parazity lidí i zvířat. Jsou nejčastěji nacházena v dutině ústní, v horní části respiračního traktu a v urogenitálním traktu. Většina mykoplazmat izolovaných ze skotu, krysy, myši, ovcí, koz a prasat jsou patogenní. Některá jsou asociována s určitým živočišným druhem, jiná lze nalézt v celé řadě hostitelů. Také míra patogenity se u jednotlivých hostitelů liší (Parker a Duerden, 1993). U člověka bylo izolováno 11 druhů rodu *Mycoplasma*, dva druhy rodu *Acholeplasma* a jeden druh rodu *Ureaplasma*, a to nejčastěji z orofaryngu. Jen 5 druhů jednoznačně způsobuje onemocnění, a to *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma fermentans* a *Ureaplasma urealyticum* (Cimolai, 2001, Taylor-Robinson, 1999).

Mycoplasma pneumoniae vyvolává u člověka široké spektrum onemocnění od asymptomatických infekcí přes mírné katary horních dýchacích cest až po těžké pneumonie (Bednář et al., 1994). Infekce se vyskytuje celosvětově, především v chladnějších měsících a častěji u dětí ve věku 5 až 9 let (Razin, 2003). Epidemie bývá zaznamenána každých 4 až 8 let (Murray et al., 1990). Přenos probíhá vzdušnou cestou, je však potřeba užší kontakt s infikovanou osobou (Bednář et al., 1996).

Nejznámějšími mykoplazmaty způsobujícími onemocnění urogenitálního traktu jsou *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*. Jsou původci široké škály infekcí. Je prokázán jejich význam při bakteriální vaginóze, uretritidách, pyelonefritidách, epidydimiditidách, salpingitidách, při komplikacích v těhotenství (Koch et al., 1997, Taylor-Robinson a McCormack, 1980). *Mycoplasma genitalium* je popisováno jako původce negonokokové uretritidy (Taylor-Robinson et al., 1985) a má také vztah k infertilitě u žen (Baczynska et al., 2007). S komplikacemi (především nefropatiemi) u HIV pozitivních pacientů je spojováno *Mycoplasma fermentans* (Cimolai, 2001). Dalším patogenem urogenitálního traktu je *Mycoplasma penetrans*. Je také nalézáno u HIV pozitivních pacientů (Cunha et al., 1998). Jeho význam však dosud není zcela objasněn (Cimolai 2001, Příbylová, 1999). Urogenitální mykoplazmata se šíří pohlavním stykem, popř. vertikálním přenosem z matky na plod při průchodu porodními cestami (Taylor-Robinson a McCormack, 1980).

2.4.1 Výskyt *Mycoplasma hominis*

2.4.1.1 Urogenitální infekce

Výskyt mykoplazmat v urogenitálním ústrojí mužů i žen se s věkem mění. Novorozenci mohou být kolonizováni genitálními mykoplazmaty při průchodu porodními cestami. Tento přenos byl pozorován asi u 30 % novorozenců narozených matkám, které měly pozitivní nález *Mycoplasma hominis* (Chua et al., 1998, Foy et al., 1970). Bylo zjištěno, že novorozenci narození císařským řezem bývají kolonizováni méně často. U prepubertálních dívek je *Mycoplasma hominis* diagnostikováno v 8 až 9 procentech. U chlapců v tomto věku se mykoplazmata vyskytují zřídka (Taylor-Robinson a McCormack, 1980).

Po pubertě souvisí výskyt urogenitálních mykoplazmat především se sexuální aktivitou, ale také se socioekonomickou situací a s používáním hormonální antikoncepce (Cassell et al., 1991). Unzeitig et al. (1990) uvádějí, že relativní riziko kolonizace pochvy *Mycoplasma hominis* roste s počtem pohlavních styků ženy (při 3 a méně pohlavních stycích týdně je 21,1 %, při 4 až 6 je 43,2 % a při 7 a více je 53,1 %). Prevalence *Mycoplasma hominis* rovněž výrazně stoupá s počtem sexuálních partnerů (u žen s 1 partnerem je 28,2 %, se 2 partnery 33,8 %, se 3 partnery 46,5 %). K podobným výsledkům dospěli i Elshibly et al. (1996). V závislosti na věku žen byla nejvyšší záchytnost *Mycoplasma hominis* mezi 31. – 40. rokem života (41,6 %) a u žen do 20 let (36,2 %), nejnižší ve skupině žen nad 50 let (26,8 %) (Unzeitig et al., 1990). Podobné závislosti uvádějí Taylor-Robinson a McCormack (1980) u mužů.

Mycoplasma hominis je často nalézáno v genitálním traktu zdravých žen, ale přesto je považováno za potencionální patogen (Parker a Duerden, 1993). Ženy s pozitivním nálezem si výrazně častěji stěžují na „rybí zápach“, mají pozitivní aminový test, vaginální pH vyšší než 4,7 a mikroskopicky viditelné tzv. „klíčové buňky“ (Mardh et al., 1997). Tyto projevy mohou být také důsledkem výskytu *Gardnerella vaginalis*. Tento mikroorganismus je původcem bakteriální vaginózy, se kterou je *Mycoplasma hominis* často spojováno (Taylor-Robinson a Rosenstein, 1998). Ve studii Koch et al. (1997) bylo *Mycoplasma hominis* diagnostikováno 10-krát častěji u pacientek s bakteriální vaginózou než u žen bez ní. U mužů byl zjištěn výrazně vyšší výskyt *Mycoplasma hominis* současně s anaerobními bakteriemi nebo *Trichomonas vaginalis*. Vancini a Benchimol (2008) popsali intracelulární lokalizaci *Mycoplasma hominis*

v *Trichomonas vaginalis*. Dokázána je asociace *Mycoplasma hominis* s *Ureaplasma urealyticum*. Upadhyaya et al. (1983) pozorovali při nálezu *Mycoplasma hominis* zpravidla současný nález *Ureaplasma urealyticum*. Stojanova et al. (2003) uvádí asociaci s *Candida albicans*. V každém případě je při úvaze nad určením *Mycoplasma hominis* jako etiologického agens vhodné stanovit množství této bakterie ve vyšetřovaném vzorku, alespoň semikvantitativně, což usnadní klinickovi rozhodování o významu nálezu (Votava a Ondrovčík, 1998). Pokud není prokázáno jiné infekční agens, mají mykoplazmata patogenetický význam je-li jich více než 10^5 /ml (Breckwoltdt et al., 1997).

Baczynska et al. (2007) prokázala, že *Mycoplasma hominis* není schopno působit morfologické změny na epitelu vejcovodů. Tím také vyvrátila diskutovaný vztah mezi *Mycoplasma hominis* a infertilitou. Naopak tato schopnost byla prokázána u *Mycoplasma genitalium*.

Výskyt *Mycoplasma hominis* v těhotenství může, kromě již zmíněného rizika přenosu na novorozence, být také původcem poporodní nebo popotratové horečky (Waites et al., 2005). Usui et al. (2002) zjistili vztah mezi výskytem tohoto mikroorganismu a předčasnými porody před 33. týdnem těhotenství. Vliv *Mycoplasma hominis* na porodní váhu novorozence nebyl na rozdíl od ureaplazmat prokázán (Braun et al., 1971).

Mycoplasma hominis je také spojováno se zánětlivým onemocněním pánve (PID – Pelvic Inflammatory Disease), jeho úloha zde však není zcela objasněna (Dayan, 2006).

Studie Machado et al. (2001) dokazuje, že ženy se SLE (Systemic Lupus Erythematosus) mají vyšší frekvenci genitálních infekcí *Mycoplasma hominis* ve srovnání se zdravými ženami.

U mužů způsobuje *Mycoplasma hominis* negonokokové uretritidy, prostatidy, epididymitidy a Reiterovu chorobu (Taylor-Robinson a McCormack, 1980). Zambor et al. (1990) prokázali přítomnost samotného *Mycoplasma hominis* u 17,87 % mužů s uretritidou, a spolu s *Ureaplasma urealyticum* u 12,85 % mužů s tímto onemocněním.

2.4.1.2 Extragenitální infekce

Důkazem, že *Mycoplasma hominis* není pouze urogenitálním patogenem bylo vyvolání faryngitidy a cervikální lymfadenopatie po orálním podání dobrovolníkům (Taylor-Robinson a Rosenstein, 2001).

Extragenitální infekce *Mycoplasma hominis* jsou poměrně běžné u novorozenců, imunosuprimovaných jedinců a/nebo pacientů s hypogamaglobulinémií (Razin, 2003). Meyer a Clough (1993) vykultivovali *Mycoplasma hominis* z krve, vaskulárního systému, ran, centrálního nervového systému, kloubů a respiračního traktu.

U novorozenců je infekce prokazatelná v nasofaryngeálním sekretu (Chua et al., 1998). *Mycoplasma hominis* může způsobit respirační infekce (Taylor-Robinson, 1999) a meningitidy (Mardh, 1983), zejména u novorozenců narozených předčasně a s velmi nízkou porodní hmotností (Taylor-Robinson, 1999, Waites et al., 1988). Dále byly u novorozenců popsány perikardiální efúze, záněty podčelistní žlázy a abscesy pokožky hlavy (Cassell et al., 1991).

U některých pacientů s hypogamaglobulinémií způsobují mykoplazmata z urogenitálního traktu zánět kloubů (Taylor-Robinson, 1999). Schaeffer et al. (1997) popisuje nález *Mycoplasma hominis* v synoviální tekutině pacientů s revmatoidní nebo jinou chronickou artritidou. *Mycoplasma hominis* bylo prokázáno při sepsi po traumatu a výkonech v urogenitální oblasti. Dále bylo nalezeno v mozkových abscesech a kostní dřeni při osteomyelitidě. Hematogenní rozsev a následná septická artritida, infekce ran po chirurgickém zákroku a peritonitida vznikají častěji u pacientů se sníženou imunitou při imunosupresivní terapii (Taylor-Robinson, 1999). Zvláště časté jsou ranné infekce sternu způsobené *Mycoplasma hominis* u pacientů po transplantaci srdce a plic (Hopkins et al., 2002). García et al. (2007) se ve své práci zabýval izolací *Mycoplasma hominis* u kriticky nemocných pacientů s plicními infekcemi. Domnívá se, že tento mikroorganismus byl možnou příčinou smrti 4 pacientů.

Klinické znaky infekcí způsobených *Mycoplasma hominis* jsou nespecifické. U většiny případů se infekce projevuje horečkou (teplota nad 38 °C) a leukocytózou (více než 10 500 leukocytů/mm³) (Madoff a Hooper, 1988).

2.4.2 Výskyt *Ureaplasma urealyticum*

2.4.2.1 Urogenitální infekce

Výskyt *Ureaplasma urealyticum* je závislý na věku jedince. Stejně jako *Mycoplasma hominis*, může být infekce *Ureaplasma urealyticum* přenesena na novorozence již při porodu. Chua et al. (1998) uvádí procento přenosu z matky

kolonizované *Ureaplasma urealyticum* na její dítě rovno 88,2 %. U prepubertálních dívek je infekce tímto mikroblem zaznamenána u 9 až 22 %, u chlapců se vyskytuje ojediněle (Taylor-Robinson a McCormack, 1980).

Výskyt *Ureaplasma urealyticum* u dospělých souvisí se sexuální aktivitou, socioekonomickou situací a s používáním hormonální antikoncepce (Cassell et al., 1991). Výsledky průzkumu Unzeitiga et al. (1990) zaměřeného na průkaz *Ureaplasma urealyticum* jsou podobné jako u *Mycoplasma hominis*. Relativní riziko kolonizace *Ureaplasma urealyticum* stoupá s počtem pohlavních styků ženy za týden (při 3 a méně stycích je 54,4 %, při 4 až 6 je 59,3 % a při 7 a více je 65,3 %), s počtem sexuálních partnerů (u žen s 1 partnerem je 45,6 %, se 2 partnery je 57,4 %, se 3 partnery 69,8 % a se 4 a více partnery je 86,7 %) i s věkem (a tím pravděpodobně i s hormonální situací) ženy. Ureaplazmata kolonizují ženy převážně v období pohlavní zralosti, po menopauze procento kolonizovaných žen klesá (Unzeitig et al., 1990). U mužů s příznaky uretritidy se dle studie Zambora et al. (1990) vyskytuje *Ureaplasma urealyticum* samostatně v 69,28 % a v 12,85 % společně s *Mycoplasma hominis*.

Stejně jako *Mycoplasma hominis* se *Ureaplasma urealyticum* nachází často v urogenitálním systému zdravých lidí. Vedle *Chlamydia trachomatis* může být další příčinou negonokokových uretritid (Kiliç et al., 2004, Taylor-Robinson a Furr, 1997). U žen je izolováno při abortech a porodech mrtvých plodů (Donders et al., 2000), u předčasných porodů (Hájek et al., 2005) a u kongenitálních nákaz novorozenců (Chua et al., 1999). Braun et al. (1971) prokázali vliv kolonizace matky *Ureaplasma urealyticum* na sníženou porodní váhu novorozenců. Zřejmá je asociace s bakteriální vaginózou, která ale není tak výrazná jako u *Mycoplasma hominis* (Waites et al., 2005). *Ureaplasma urealyticum* může být také původcem horečky po porodu či potratu (Taylor-Robinson a Furr, 1997).

U mužů jsou ureaplazmata izolována z prostatitid (Brunner et al., 1983). *Ureaplasma urealyticum* je také spojováno se sníženou pohyblivostí a množstvím spermií vedoucím k infertilitě mužů (Taylor-Robinson a McCormack, 1980, Koch et al., 1997, Zinzendorf et al., 2008).

Významnou roli představují ureaplazmata v patogenezi močových kamenů. Jejich vznik je pravděpodobně spojen s ureázovou aktivitou (Taylor-Robinson a McCormack, 1980). Napomáhají krystalizaci struvitu a kalciumfosfátu. V moči a konkrémentech u pacientů s infikovanými kameny jsou ureaplazmata diagnostikována častěji než u

pacientů s metabolickými kameny, což nasvědčuje jejich etiologické úloze (Taylor-Robinson, 1999).

Diskutována je spojitost se zánětlivým onemocněním pánve (PID) (Dayan, 2006).

Ureaplasma urealyticum se vyskytuje ve 2 biovarech. Gupta et al. (2008) zjistil, že Biovar 1 u genitálních infekcí převládá, ale nebyla pozorována žádná odlišnost v zastoupení těchto dvou biovarů mezi symptomatickými a asymptomatickými případy.

2.4.2.2 Extragenitální infekce

Podobně jako *Mycoplasma hominis* způsobuje *Ureaplasma urealyticum* extragenitální infekce především u novorozenců, infikovaných při průchodu porodními cestami, a u imunosuprimovaných jedinců.

U novorozenců způsobují ureaplazmata převážně meningitidy. Snáze invadují do mozkomíšního moku u předčasně narozených dětí (Taylor-Robinson, 1999, Waites et al., 1988). Dalším častým projevem při infekci novorozenců *Ureaplasma urealyticum* bylo intraventrikulární krvácení, v pozdějších měsících po porodu pak docházelo k napadení kloubů (Waites et al., 1988). Infekce může také napadat plíce a způsobovat pneumonii (Cimolai, 2001).

Při infekci pacientů se sníženou imunitou, při hypogamaglobulinémii se dostávají ureaplazmata často z urogenitálního traktu do kloubů. U některých pacientů je zánět kloubů spojen s podkožními abscesy, přetrvávající uretritidou a chronickou cystitidou (Taylor-Robinson, 1999).

Je prokázáno vyšší riziko ureaplazmových infekcí u žen se systémovým lupus erythematosus (SLE) (Machado et al., 2001).

2.5 Citlivost mykoplazmat

2.5.1 Citlivost na antibiotika

Obecně jsou mykoplazmata citlivá k antibiotikům jako tetracykliny nebo makrolidy, které inhibují proteosyntézu. Vzhledem k absenci peptidoglykanu jsou zcela rezistentní k antibiotikům beta-laktamovým a k dalším působícím na jeho syntézu, a

k sulfonamidům (Cassell et al., 1991, Bednář et al., 1994, Parker a Duerden, 1993). Většina antibiotik pouze zastavuje množení mykoplazmat, ale neusmrcuje je, což vysvětluje pomalou eradikaci těchto mikrobů a relapsy (Taylor-Robinson, 1999).

Mycoplasma pneumoniae je jako ostatní mykoplazmata citlivé k tetracyklinu, je však více než jiná mykoplazmata izolovaná z člověka citlivé k erytromycinu (Taylor-Robinson, 1999). Tetracyklin je používán při léčbě dospělých, erytromycin u dětí do 12 let a těhotných žen (Cimolai, 2001).

Tetracyklin, který má výhodu v účinnosti proti chlamydiím (běžnému patogenu negonokokové uretritidy), je také účinný proti *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*. Narozdíl od ostatních mykoplazmat, je *Mycoplasma hominis* rezistentní k erytromycinu (Murray et al., 1990).

V posledních letech je pozorován nárůst rezistence mykoplazmat k tetracyklinu. Tato rezistence je vysvětlována přítomností *tetM* genu (Cimolai, 2001, Taraskina et al., 2002). Frekvence tetracyklinové rezistence u genitálních mykoplazmat je pravděpodobně ovlivněna geografickými faktory, antibiotickým tlakem a sexuální promiskuitou dospělých (Waites et al., 2005). Procento rezistentních kmenů *Mycoplasma hominis* se u jednotlivých autorů liší a pohybuje se v rozmezí 12,5 až 40 % (Kiliç et al., 2004, Waites et al., 2005). Případají pak v úvahu jiná antibiotika, například linkomycin nebo klindamycin (Bednář et al., 1996, Taylor-Robinson, 1999). Pro ureaplazmata rezistentní k tetracyklinu v 10 – 35 % (Chua et al., 1998, Waites et al., 2005) jsou vhodnými antibiotiky erytromycin a spektinomycin (Murray et al., 1990).

Kiliç et al. (2004) označují za antibiotika první volby proti *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* doxycyklin nebo ofloxacin.

Přehled testovaných antibiotik a minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma* spp. uvádí Tabulka II.

Tabulka II: Minimální inhibiční koncentrace vybraných antibiotik pro *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma* spp. (Waites et al., 2005).

Antibiotikum	MIC (µg/ml)	
	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma</i> spp.
Tetracyklin	0,2 – 2	0,05 – 2
Doxycyklin	0,1 – 2	0,02 – 1
Erytromycin	32 - > 1000	0,02 – 16
Roxitromycin	> 16	0,1 – 2
Diitromycin	> 64	0,25 – 2
Klaritromycin	16 - > 256	≤ 0,004 – 2
Azitromycin	4 – 64	0,5 – 4
Cetromycin	≤ 0,008 – 0,031	≤ 0,008 – 0,031
Telitromycin	2 – 16	≤ 0,015 – 0,06
Josamycin	0,05 – 2	0,5 – 4
Klindamycin	≤ 0,008 – 2	0,2 – 64
Linkomycin	0,2 – 1	8 – 256
Pristinamycin	0,1 – 0,5	0,1 – 1
Spiramycin	32 - > 64	4 – 32
Chloramfenikol	4 – 25	0,4 – 8
Gentamycin	2 – 16	0,1 – 13
Ciprofloxacin	0,1 – 4	0,1 – 16
Ofloxacin	0,1 – 64	0,2 – 25
Levofloxacin	0,1 – 2	0,2 – 2
Sparfloxacin	≤ 0,008 – 0,1	0,003 – 1
Gatifloxacin	0,016 – 0,25	0,125 – 1
Moxifloxacin	0,06 – 0,12	0,12 – 0,5
Gemifloxacin	0,0025 – 0,06	0,03 – 0,5
Garenoxacin	0,008 – 0,063	0,016 – 1
Rifampin	> 1000	> 1000
Quinupristin/dalfopristin	0,25 – 0,8	0,12 – 0,5
Nitrofurantoin	6 – 500	13 - > 1000

2.5.2 Testování citlivosti na antibiotika

2.5.2.1 Bujónová diluční metoda

Principem bujónové diluční metody je příprava řady zkumavek s kultivačním médiem o různé koncentraci antibiotik, do kterých se očkuje inokulum testovaného kmene. Po inkubaci se určí zkumavka ve vzestupné řadě, v níž již nedošlo k pomnožení (růstu) kmene. Nejnižší koncentrace antibiotika, při které došlo k inhibici se určí jako minimální inhibiční koncentrace (MIC). Detekce růstu mykoplazmat nelze sledovat hodnocením zákalu, ale využívá se jejich biochemické aktivity. Pro stanovení MIC *Mycoplasma hominis* se tak do kultivačního média přidává arginin, pro *Ureaplasma*

urealyticum pak urea. Dochází ke štěpení příslušného substrátu za vzniku amoniaku a tím k vzestupu pH indikovaného acidobazickým indikátorem (Cummings a McCormack, 1990). Tato technika je využívána v řadě komerčně dodávaných setů pro diagnostiku mykoplazmat.

2.5.2.2 Agarové techniky

Pro zjišťování MIC antibiotik je také využívána agarová diluční metoda. Na disky se nanáší inokulum obsahující $10^2 - 10^4$ bakterií a výsledek je hodnocen pozorováním nárůstu kolonií pod mikroskopem (Cimolai, 2001, García et al., 2007).

Disková difúzní metoda ve svém konvenčním formátu není používána kvůli pomalému růstu těchto mikroorganismů. Nicméně se používá E-test využívající gradient antibiotika na nosiči s měřítkem, na kterém lze přímo v místě hranice inhibiční zóny odečíst hodnotu MIC (Cimolai, 2001, Samra et al., 2002).

2.5.3 Citlivost k vnějším podmínkám a chemickým látkám

Mykoplazmata jsou citlivá na vyschnutí a na teplotu nad 50 °C. Mimo hostitele jsou však patogenní druhy schopny přežít v mikroprostředí chráněném před slunečním zářením i několik dní (Bednář et al., 1994, Quinn et al., 1994).

Ačkoli má sérum ve vysoké koncentraci protektivní charakter, většinu mykoplazmat usmrcuje vystavení teplotě 56 °C po dobu 30 minut. Mykoplazmata jsou nejlépe uchovávána při teplotě -70 °C nebo v tekutém dusíku. Prakticky beze ztráty životaschopnosti je lze skladovat v -70 °C po dobu 42 měsíců. V tekutém dusíku je zachována stabilita mykoplazmat po dobu 3 – 9 let. Lyofilizované mikroorganismy v kultivačním médiu mohou přežít až 20 let uchována při 0 – 5 °C (Parker a Duerden, 1993).

Mykoplazmata jsou poškozována povrchově aktivními látkami a tukovými rozpouštědly (Bednář et al., 1994). Antiseptické roztoky, analgetika a lubrikanty používané často v porodnictví a gynekologické praxi inhibují růst *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* (Parker a Duerden, 1993). Růst mykoplazmat podporují steroidy, které jsou obsaženy v celé řadě hormonálních přípravků (Hirai et al., 1991).

Mykoplazmata jsou rozpustná ve žluči a růst steroly-vyžadujících druhů je inhibován digitoninem (Parker a Duerden, 1993).

2.6 Průkaz mykoplazmat

2.6.1 Vyšetřovaný materiál

Klinický materiál se odebírá dle druhu onemocnění a metody stanovení mykoplazmat, vždy před léčbou antibiotiky. Pro průkaz *Mycoplasma pneumoniae* mikroskopii, kultivační metodou nebo polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) se odebírá sputum, bronchiální výplachy, nasofaryngeální výtěry, pleurální tekutina, popř. perikardiální nebo cerebrospinální tekutina. *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* jsou těmito metodami prokazována v gynekologických vzorcích, výtěrech z uretry, moči, ejakulátu, dále v kloubních tekutinách, amniové tekutině, tracheálním aspirátu novorozenců a v krvi. Sérologická detekce se provádí v krvi (Bednář et al., 1996, Cimolai, 2001, Keane et al., 2000, Waites et al., 2005).

Materiál se odebírá do transportního (konzervačního) média, aby nevyschl, a zpracovává se co nejrychleji (Bednář et al., 1996, Quinn et al., 1994).

2.6.2 Kultivace mykoplazmat

2.6.2.1 Kultivační média

Mykoplazmata mají omezené biosyntetické schopnosti, pravděpodobně dané malým genomem a parazitickým způsobem života. Většina proto vyžaduje pro svůj růst specifické růstové faktory a isotonické médium (Parker a Duerden, 1993, Quinn et al., 1994).

Základním médiem je kvalitní hovězí extrakt se suplementy. Rody *Mycoplasma* a *Ureaplasma* vyžadují cholesterol, který je obvykle zajištěn přidavkem koňského séra. Další růstové faktory (prekurzory nukleových kyselin) jsou obsaženy v přidaném kvasničném extraktu. Dále jsou součástí média antibiotika, nejčastěji penicilin, pro inhibici gram-pozitivních bakterií a octan thallný pro inhibici plísní a gramnegativních bakterií. Octan thallný se nepřidává do půd pro ureaplazmata, protože je pro ně škodlivý. Arginin je přidáván jako substrát pro druhy rodu *Mycoplasma*, urea pro druhy rodu *Ureaplasma*. Přeměna těchto substrátů spojená se zvýšením pH je indikována změnou barvy acidobazického indikátoru přítomného v médiu. Výsledné pH je nutno

upravit na hodnotu 7,2 až 7,8 pro mykoplazmata a na hodnotu 6,0 pro ureaplazmata. Půda není vždy standardní, různé várky uvedených složek mají různou schopnost podporovat růst. Pro úspěch kultivace je nutno s touto skutečností počítat. Toto základní médium i jeho součásti mohou být zakoupeny komerčně. Půdy mají charakter bujónu nebo pevného agaru. Nazývají se PPLO média (dle již zmiňovaného Pleuro-Pneumonia Like Organisms) (Murray et al., 1990, Quinn et al., 1994, Taylor-Robinson, 1999, Zambor et al., 1990).

Kvalita vody pro přípravu média musí být shodná s kvalitou vody používané při práci s tkáňovými kulturami (Quinn et al., 1994).

Složení základního média pro kultivaci mykoplazmat (Quinn et al., 1994):

Kultivační médium:	PPLO broth (DIFCO)	16,8 g
	destilovaná voda	800 ml
	koňské sérum	200 ml
	50 % kvasničný extrakt	10 ml
	DNA (SIGMA)	0,02 g
	penicilin	2000 jednotek/ml média
	octan thallný	1:100,000

Pro získání pevného agarového média stačí nahradit 16,8 g PPLO broth základu 28 g PPLO agarového základu (DIFCO).

2.6.2.2 Inkubační podmínky

Většina mykoplazmat je fakultativně anaerobní. Protože v primokultuře rostou často jen za anaerobních podmínek, je lépe je izolovat kultivací v atmosféře složené z 95 % dusíku a 5 % CO₂. V nepřetržité kultivaci někdy vyžadují striktně anaerobní podmínky.

Optimální teplota pro rody *Mycoplasma* a *Ureaplasma* je většinou 36 – 38 °C (Bednář et al., 1994, Parker a Duerden, 1993, Taylor-Robinson, 1999).

2.6.2.3 Růst v tekutých půdách

Detekce růstu mykoplazmat nelze sledovat hodnocením zákalu, ale využívá se jejich biochemické aktivity. Pro stanovení *Mycoplasma hominis* se tak do kultivačního

média přidává arginin, pro *Ureaplasma urealyticum* urea. Dochází ke štěpení příslušného substrátu za vzniku amoniaku a tím k vzestupu pH indikovaného acidobazickým indikátorem (Cummings a McCormack, 1990). Tato technika je využívána v řadě komerčně dodávaných setů pro diagnostiku mykoplazmat. Růst v tekutých médiích je obvykle viditelný za 1 až 5 dnů (Clegg et al., 1997).

Clegg et al. (1997) využívají tekutá média pro pomnožení mykoplazmat a růst poté potvrzují na médiích agarových. *Ureaplasma urealyticum* vyžaduje pro růst ureu, přičemž ale zvýšením pH spojeným s metabolismem urey svůj růst inhibuje. Média musí být proto mimo obsahu močoviny vysoce pufována. Přesto ale ureaplazmata rychle po původní izolaci hynou (Murray et al., 1990).

2.6.2.4 Růst na agarových půdách

Mykoplazmata rostou pomalu s generační dobou 1 až 6 hodin a tvoří malé kolonie (velikosti do 0,5 mm) typického vzhledu „sázeného vejce“. Centrální tmavá část kolonie je konicky vrostlá do půdy, periferie je složena z transparentních elementů a roste na povrchu půdy (viz. Obr.1) (Bednář et al., 1994).

Kolonie ureaplazmat (nazývané také T-druhy - T jako tiny, angl. drobounký) jsou velmi malé, v průměru 10 až 50 μm (Murray et al., 1990). Pro jejich lepší vizualizaci je do agaru přidáván síran manganatý. Je to látka, která indikuje přítomnost amoniaku v agaru a kolonie ureaplazmat se zbarví tmavohnědě (Zambor et al., 1990). *Mycoplasma hominis* roste ve větších koloniích, v průměru 50 až 300 μm (Evans et al., 2007). Kolonie jsou pozorovatelné po 1 až 4 dnech inkubace a je nutno je prohlížet pod mikroskopem při zvětšení 25x až 100x (Murray et al., 1990). Obecně nezávisí velikost kolonií jen na druhu mykoplazmat, ale také na složkách a stupni hydratace média, koncentraci agaru, atmosférických podmínkách a stáří kultury (Parker a Duerden, 1993).

2.6.2.5 Kultivační systémy pro rychlou diagnostiku mykoplazmat

Tradiční kultivační technika pro detekci a identifikaci mykoplazmat je pracná, mikroorganismy mají vysoké růstové požadavky a jsou snadněji přerůstány jinými mikroorganismy. Ke zdokonalení detekce a identifikace mykoplazmat jsou vyvíjeny jiné metody jako polymerázová řetězová reakce (PCR). Nicméně dosud není dostupná

žádná komerční nebo standardizovaná PCR metoda pro detekci mykoplazmat. Jako alternativní se jeví vývoj komerčních kultivačních kitů, které jsou jednoduché a rychlé (Evans et al., 2007).

Komerční kit Mycoplasma IST (BIOMÉRIEUX)

Komerční kit Mycoplasma IST francouzské firmy BIOMÉRIEUX umožňuje kultivaci, identifikaci, kvantifikaci a testování citlivosti urogenitálních mykoplazmat pomocí kombinace selektivního bujónu a stripu. Princip je založen na biochemické aktivitě mykoplazmat, *Mycoplasma hominis* štěpí arginin, *Ureaplasma urealyticum* ureu, za vzniku amoniaku. Dojde ke zvýšení pH bujónu a změně barvy ze žluté na červenou. Výsledky je možné určit po 24 až 48 hodinách inkubace. Starší verze kitu (Mycoplasma IST) umožňovala testování citlivosti na 6 antibiotik, u novější verze (Mycoplasma IST 2) je spektrum antibiotik rozšířeno o další 3 (<http://www.biomerieux-diagnostics.com>, 2009, Veselská, 2009).

Clegg et al. (1997) prokázali shodu výkonnosti setu Mycoplasma IST a kultivační metody.

Komerční kit Mycofast Screening Evolutions 3 (ELITECH)

Tento diagnostický systém pochází také z Francie a je založen na stejném principu jako Mycoplasma IST. Testování citlivosti mykoplazmat zahrnuje 7 antibiotik. Výsledky na pozitivitu/negativitu mykoplazmat je možno odečíst již po 24 hodinách, citlivost na antibiotika po 48 hodinách inkubace (<http://www.elitechgroup.com>, 2009, Veselská, 2009).

Komerční kit Mycoplasma Duo (BIO-RAD)

Mycoplasma Duo francouzské firmy BIO-RAD je opět určen pro diagnostiku genitálních mykoplazmat a je založen na stejném principu jako předchozí testy. Nevýhodou Mycoplasma Duo setu je nemožnost provádět současně identifikaci mykoplazmat a testování citlivosti na antibiotika. Výsledky je možné odečítat po 24 až 48 hodinové inkubaci (<http://www.bio-rad.com>, 2009, Evans et al., 2007, Příbylová, 1999).

Komerční kit MYCOPLASMA SYSTEM Plus (LIOFILCHEM)

MYCOPLASMA SYSTEM Plus italské firmy LIOFILCHEM je analogem k předcházejícím testům. Součástí setu je testování citlivosti na 9 antibiotik ve dvou ředěních. Navíc je zde zařazena jamka pro zjišťování přítomnosti *Trichomonas vaginalis* a *Candida albicans* ve vzorku. Výsledky jsou opět odečítány po 24 až 48 hodinách inkubace (www.liofilchem.net, 2009).

2.6.3 Identifikace mykoplazmat

2.6.3.1 Barvení kolonií mykoplazmat

Na agarovém médiu obsahujícím vysokou koncentraci séra, zvláště při prodloužené inkubaci, se může objevit tvorba tzv. pseudokolonií, které lze snadno zaměnit s pravými koloniemi mykoplazmat. Kolonie mykoplazmat se ale n rozdíl od těchto pseudokolonií barví Dienesovým barvivem (metylenová modř, azur II, maltóza, Na₂CO₃, kyselina benzoová, destilovaná voda). Také je možno obarvit Giemsou otisk kolonií na sklíčku po fixaci Bouinovou tekutinou (Parker a Duerden, 1993, Zahradnický et al., 1987).

2.6.3.2 Biochemické testy

Detekce a identifikace mykoplazmat může být prováděna biochemickými testy využívajícími štěpení příslušného substrátu (arginin, urea) za vzniku amoniaku. Zvýšení pH média je detekováno změnou barvy acidobazického indikátoru (viz. 2.6.2.3).

2.6.3.3 Sérologická identifikace

Specifická identifikace se provádí pomocí antisér proti různým druhům lidských mykoplazmat. Sérologické testy pro mykoplazmata využívají test inhibice růstu (RIT), techniky imunofluorescence a enzymovou imunoesej (ELISA).

Test inhibice růstu (RIT) je založen na inhibici růstu kultury kolem disku se specifickou protilátkou (Bednář et al., 1996).

Při imunofluorescenčním testu (tzv. epifluorescence) se fluoresceinem značená antiséra aplikují na celé kolonie mykoplazmat (Del Giudice et al., 1967). Imunofluorescenční techniky jsou vhodné k identifikaci mykoplazmat ve smíšených kulturách (Quinn et al., 1994).

Sérologická diagnostika *Ureaplasma urealyticum* je komplikována existencí čtrnácti sérotypů (Cimolai, 2001).

2.6.3.4 Molekulárně biologické metody

Přímé sondy jsou technicky náročné a je těžké dosáhnout detekčního limitu pod 10^3 . DNA-sondy vyvinuté pro průkaz *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* jsou méně citlivé než kultivační vyšetření (Cimolai, 2001, Taylor-Robinson, 1999)

Stále častěji využívanou metodou pro detekci a identifikaci mykoplazmat je polymerázová řetězová reakce (PCR). Narozdíl od ostatních metod odhalí PCR životaschopné, ale i již usmrcené mikroorganismy (Cimolai, 2001). Detekční limit je mnohem nižší než u kultivace, PCR vykazuje také vyšší senzitivitu a výsledky jsou dostupné již během jednoho dne (Cunha et al., 1998, Waites et al., 2005). Komplikací této metody může být přítomnost inhibitorů PCR ve vzorku. Toto lze však odhalit kontrolou pomocí referenčního kmene (Gupta et al., 2008).

2.6.4 Nepřímá diagnostika mykoplazmových infekcí

Pro nepřímý průkaz infekce mykoplazmaty jsou citlivé a specifické reakce komplementfixační a test inhibice metabolismu (MIT). Velmi citlivé a specifické jsou metody ELISA, RIA a IHT (inhibice hemaglutinace), které provádějí specializovaná pracoviště. Dříve užívané, nespecifické a málo citlivé testy (chladové aglutininy aj.) se dnes již pro diagnostiku nedoporučují (Bednář et al., 1996, Cimolai, 2001).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Vyšetřovaný materiál

Vyšetřovaným materiálem byly stěry z děložního krčku žen a výtěry uretry mužů. K odběru byly použity komerčně dodávané sterilní vatové tampóny. Pacienti zařazení do studie byli vybráni dle požadavků lékařů na vyšetření přítomnosti *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* v LKM s.r.o. Šternberk.

Vzorky byly dopravovány do laboratoře v komerčně vyráběném transportním médiu Mycoplasma transport broth (firma LIOFILCHEM, č. š. 03128045, 04178055) a ihned zpracovány.

3.1.2 Kultivační média

Kultivační média byla připravována v mikrobiologické laboratoři KBBV Univerzity Pardubice a převážena zchlazena v termoboxu do LKM s.r.o. Šternberk. Zde byla poté uskladněna v lednici při 4 – 5 °C po dobu nejdéle 3 týdnů.

3.1.2.1 Příprava médií

PPLO bujón pro kultivaci *Mycoplasma hominis* (200 ml)

4,2 g PPLO broth (firma DIFCO, č. š. 5221158) bylo rozpuštěno ve 140 ml redestilované vody a sterilizováno 50 – 60 minut v autoklávu při 121 °C. Po ochlazení na teplotu 50 – 60 °C byly přidány další složky:

- 20 ml kvasnicového extraktu
- 40 ml koňského séra
- 1 ml ampicilinu
- 1 g argininu
- 400 µl 1% roztoku fenolové červeně
- 1,6 ml 10% roztoku octanu thallného

Nakonec bylo pH média upraveno 10% roztokem HCl a 10% roztokem NaOH na 6,5 – 6,8.

PPLO bujón pro kultivaci *Ureaplasma urealyticum* (200 ml)

4,2 g PPLO broth (firma DIFCO, č. š. 5221158) bylo rozpuštěno ve 140 ml redestilované vody a sterilizováno 50 – 60 minut v autoklávu při 121 °C. Po ochlazení na teplotu 50 – 60 °C byly přidány další složky:

- 20 ml kvasnicového extraktu
- 40 ml koňského séra
- 1 ml ampicilinu
- 400 µl 40% roztoku urey
- 400 µl 1% roztoku fenolové červeně
- 1,6 ml linkomycinu

Nakonec bylo pH média upraveno 10% roztokem HCl a 10% roztokem NaOH na 6,0 – 6,3.

PPLO agar pro kultivaci *Mycoplasma hominis* (200 ml)

7 g PPLO agaru (firma DIFCO, č. š. 2126603) bylo rozpuštěno ve 140 ml redestilované vody. pH bylo upraveno 10% roztokem HCl a 10% roztokem NaOH na 6,3. Roztok byl sterilizován 50 – 60 minut v autoklávu při 121 °C. Po ochlazení na teplotu 50 – 60 °C byly přidány další složky:

- 20 ml kvasnicového extraktu
- 40 ml koňského séra
- 1 ml ampicilinu
- 1,6 ml 10% roztoku octanu thallného

Připravená půda byla za tepla rozlévána do připravených polystyrénových Petriho misek (Ø 60 mm) do výšky 4 mm.

PPLO agar pro kultivaci *Ureaplasma urealyticum* (200 ml)

7 g PPLO agaru (firma DIFCO, č. š. 2126603) a 0,03 g MnSO₄ (p.a., DORAPIS) bylo rozpuštěno ve 140 ml redestilované vody. pH bylo upraveno 10% roztokem HCl a 10% roztokem NaOH na 6,0. Roztok byl sterilizován 50 – 60 minut v autoklávu při 121 °C. Po ochlazení na teplotu 50 – 60 °C byly přidány další složky:

- 20 ml kvasnicového extraktu

- 40 ml koňského séra
- 1 ml ampicilinu
- 400 µl 40% roztoku urey
- 400 µl 1% roztoku fenolové červeně
- 1,6 ml linkomycinu

Připravená půda byla za tepla rozlévána do připravených polystyrénových Petriho misek (Ø 60 mm) do výšky 4 mm.

3.1.2.2 Příprava jednotlivých složek médií

Kvasnicový extrakt

1 kg čerstvých pekařských kvasnic byl důkladně homogenizován v 500 ml horké redestilované vody a následně doplněn do 1000 ml redestilovanou vodou. Suspenze byla za stálého míchání zahřívána na 80 °C po dobu 45 minut. Po ochlazení byla směs centrifugována 30 minut při 3000 ot./min. Supernatant byl opakovaně (3x) sterilizován v autoklávu při teplotě 80 °C. Sterilní extrakt byl skladován v lahvičkách (80 ml) při -20 °C nejdéle jeden rok.

Koňské sérum

Koňské sérum bylo dodáváno firmou LabMediaServis s.r.o., Huntířov. Neinaktivované koňské sérum bylo uchováváno v 80 ml sterilních lahvičkách při -20 °C nejdéle jeden rok.

Ampicilin

Do lahvičky s 1 g ampicilinu (firma BIOTIKA, č. š. 0605005) bylo přidáno 5 ml sterilní redestilované vody. Roztok byl skladován při -20 °C.

Arginin

Byl používán L-Arginin pro biochemii firmy MERCK (č. š. K27674142347).

1% roztok fenolové červeně

1 g fenolové červeně (firma LACHEMA, č. š. 686981) byl rozpuštěn ve 25 ml 0,1 M NaOH. Směs byla doplněna na 100 ml redestilovanou vodou a mírně zahřívána do úplného rozpuštění. Roztok byl rozpipetován do 50 ml skleněných lahviček a

autoklávován s pootevřenou zátkou 10 minut při 115 °C. Poté byl uskladněn při laboratorní teplotě.

10% roztok octanu thallného

Do Erlenmayerovy baňky s 25 ml sterilní redestilované vody bylo přidáno 2,5 g octanu thallného (firma SIGMA, č. š. 71K1395) naváženého na sterilní fólii. Za mírného zahřívání byl octan úplně rozpuštěn. Roztok byl poté skladován v lednici při 4 – 5 °C.

Urea

Byl používán 40% roztok ury firmy HIMEDIA (č. š. F-X525).

Linkomycin

Byl používán roztok linkomycinu o koncentraci 256 mg/l firmy SIGMA (č. š. 112K0566).

Roztoky na úpravu pH kultivačních půd

10% roztok HCl

Bylo smícháno potřebné množství HCl p.a. (firma LACHEMA, č. š. 685001) a sterilní redestilované vody.

10% roztok NaOH

Bylo smícháno potřebné množství NaOH p.a. (firma PENTA, č. š. 030806) a sterilní redestilované vody.

3.1.3 Komerční set MYCOPLASMA SYSTEM Plus

Pro průkaz *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* byl používán komerčně dodávaný set MYCOPLASMA SYSTEM Plus italské firmy LIOFILCHEM (č. š. 04108216, 05308212). Součástí setu jsou ampulky s fyziologickým roztokem (č. š. 02098009) pro vytvoření suspenze k inokulaci. Set byl skladován dle doporučení výrobce v lednici při 4 – 5 °C.

3.1.4 Média pro zjišťování kontaminace

Základním médiem byl krevní agar (firma BIOMERIEUX, č. š. 824856701, 825309901). Pro izolaci a dourčení mikroorganismů urogenitálního traktu bylo používáno selektivní médium UriSelect 4 (firma BIORAD, č. š. 2460D).

3.1.5 Přístroje a pomůcky

3.1.5.1 Přístroje

Laminární box, lednice, mrazicí box, pH metr, autokláv, horkovzdušný sterilizátor, vodní lázeň, digitální a analytické váhy, plynový kahan, aparatury pro výrobu destilované a redestilované vody, orbitální třepačka, anaerostat, inkubátor, světelný mikroskop.

3.1.5.2 Pomůcky

Odměrné válce, odměrné baňky, Erlenmayerovy baňky, kádinky, automatické mikropipety, plastové špičky pro automatické mikropipety, Petriho misky (Ø 60 mm), mikrotenové sáčky, termobox, sterilní vatové tampony, kapátka, buničina, skleněné zkumavky, kovové zátky na zkumavky, stojany na zkumavky, očkovací kličky.

3.2 Pracovní postup

3.2.1 Odběr vzorků

Vzorky byly odebírány lékaři požadujícími vyšetření přítomnosti *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*. Stěry a výtěry byly provedeny sterilními vatovými tampóny, které byly ihned umístěny do transportního média dodávaného lékařům laboratoří. Do LKM s.r.o. Šternberk byly vzorky doručeny sanitáři.

3.2.2 Kultivace v PPLO bujónu

Do skleněné zkumavky se 2 ml PPLO bujónu pro kultivaci *Mycoplasma hominis* nebo *Ureaplasma urealyticum* bylo inokulováno vždy 0,2 ml transportního média se vzorkem. Všechny vzorky byly souběžně testovány na přítomnost *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*. Zkumavky byly uzavřeny kovovými zátkami. Inkubace probíhala v anaerostatu při 37 °C po dobu 24 až 48 hodin.

Během inkubační doby byla pozorována změna zbarvení bujónu.

3.2.3 Kultivace na PPLO agaru

Vzorky pozitivní v PPLO bujónu byly očkovány mikropipetou na PPLO agar pro kultivaci *Mycoplasma hominis* nebo *Ureaplasma urealyticum*. 10 µl vzorku pomnoženého v PPLO bujónu bylo přeneseno na povrch agaru, který byl v místě nánosu mírně poškozen vpichem špičky pipety. PPLO agar byl poté inkubován v anaerostatu při 37 °C po dobu 3 až 7 dnů.

Pod mikroskopem byl při 200 násobném zvětšení hodnocen nárůst kolonií mykoplazmat.

3.2.4 Komerční set MYCOPLASMA SYSTEM Plus

Postup zpracování testu byl prováděn dle pokynů výrobce. Vzorek v transportním bujónu pro mykoplazmata byl nejprve protřepán pomocí orbitální třepačky. 1 ml tohoto transportního bujónu se vzorkem byl přidán do ampulky s fyziologickým roztokem, obsah byl protřepán a ponechán 5 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo přeneseno 0,2 ml (4 kapky) suspenze vzorku do každé z jamek testu (foto testu MYCOPLASMA SYSTEM Plus viz. Příloha 1). Všechny jamky s výjimkou jamky 6-TR/YE byly zakapány 3 kapkami parafinového oleje (paraffinium perliquidum, firma TAMDA, č. š. 747613), celý systém byl přikryt víkem a inkubován v inkubátoru při 37 °C po dobu 24 až 48 hodin.

Po inkubaci byla pozorována barevná změna v jamkách 1-GR+ až 5-UR.

Jamka 6-TR/YE slouží k průkazu *Trichomonas vaginalis* a *Candida spp.* a jamky 7-TE až 24-AZM obsahují řadu antibiotik ve dvojí koncentraci pro průkaz citlivosti mykoplazmat k vybraným antibiotikům. Tyto testy jsem ve své práci nevyužívala.

3.2.5 Zjišťování kontaminace

Vzorky pozitivní v PPLO bujónu nebo v jamce testu byly vyočkovávány na krevní agar pro zjištění přítomnosti případné kontaminující mikroflóry schopné štěpit arginin nebo ureu. Pro dourčení narostlých kolonií bylo používáno selektivní médium UriSelect 4.

4. VÝSLEDKY

4.1 Růst mykoplazmat a ureaplazmat v PPLO bujónu

Růst mykoplazmat a ureaplazmat v PPLO bujónu byl hodnocen vizuálně. Při nárůstu *Mycoplasma hominis* nebo *Ureaplasma urealyticum* byla po 24 – 48 hod. inkubaci pozorována změna zbarvení média ze žlutooranžové na červenou. Ta byla způsobena vznikem amoniaku při štěpení příslušného substrátu (argininu nebo urey) a následnou změnou zbarvení acidobazického indikátoru fenolčerveně (viz. Příloha 3).

4.2 Růst mykoplazmat a ureaplazmat na PPLO agaru

Hodnocení růstu mykoplazmat a ureaplazmat na PPLO agaru bylo prováděno mikroskopicky při zvětšení 200x. Po skončení inkubační doby byly pozorovány kolonie typického vzhledu „sázeného vejce“ *Mycoplasma hominis* a menší tmavé kolonie *Ureaplasma urealyticum* (viz. Příloha 4 a 5).

4.3 Vyhodnocení setu MYCOPLASMA SYSTEM Plus

Po inkubaci byla pozorována barevná změna v jamkách 1-GR+ až 5-UR. Změna barvy obsahu jamky 1-GR+ až 3-GR+++ ze žluté na červenou značí nárůst mykoplazmat nebo ureaplazmat (označení + až +++ slouží k semikvantitativnímu stanovení). Jamka 4-ADC představuje argininový test, její barevná změna je tedy průkazem přítomnosti *Mycoplasma hominis*. Jamka 5-UR představuje test ureázový a její červené zbarvení je průkazem přítomnosti *Ureaplasma urealyticum* (viz. Příloha 2).

4.4 Vliv zjištěné kontaminace

Hodnocení růstu mykoplazmat a ureaplazmat bylo komplikováno kontaminací vzorků jinými mikroorganismy, které kolonizovaly urogenitální trakt. Vzorky byly nejčastěji kontaminovány kvasinkami a *Escherichii coli*, dále se objevili *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*.

V tabulce III jsou uvedeny zjištěné kontaminující mikroorganismy a jejich schopnost hydrolyzovat arginin a ureu.

Tabulka III: Kontaminující mikroorganismy a jejich schopnost hydrolyzovat arginin a ureu

kontaminující mikroorganismus	hydrolýza argininu	hydrolýza urey
kvasinky	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-

V případě zjištění dalších mikroorganismů se schopností hydrolyzovat příslušný substrát a nepřítomnosti charakteristických kolonií mykoplazmat na PPLO agaru byl vzorek označen za negativní na přítomnost mykoplazmat nebo ureaplazmat.

4.5 Výsledky vyšetření

Celkem bylo vyšetřeno 102 vzorků z urogenitálního traktu mužů i žen. Z uvedeného počtu bylo 5 (4,9 %) vzorků s pozitivním kultivačním nálezem na *Mycoplasma hominis* a 41 (40,2 %) na *Ureaplasma urealyticum*.

Výsledky byly porovnány s výsledky komerčního setu MYCOPLASMA SYSTEM Plus a hodnoceny ve vztahu k pohlaví, věku, diagnóze a používané antikoncepci u žen.

Při průkazu *Mycoplasma hominis* podalo vyšetření kultivační metodou a komerčním setem shodné výsledky u 96 (94,1 %) vzorků. Z toho 93 (96,9 %) vzorků bylo negativních a 3 (3,1 %) vzorky pozitivní na přítomnost *Mycoplasma hominis*.

Výsledek setu a kultivační metody se lišil u 6 (5,9 %) vzorků. 4 (66,7 %) vzorky byly kultivačně negativní, zatímco set prokázal přítomnost *Mycoplasma hominis*. U 2 (33,3 %) vzorků byl pozitivní průkaz přítomnosti *Mycoplasma hominis* v kultivaci, přičemž set byl negativní.

Výsledky průkazu *Ureaplasma urealyticum* kultivační metodou a komerčním setem se shodovaly u 87 (85,3 %) vzorků. Z toho 60 (69 %) vzorků bylo negativních a 27 (31 %) pozitivních na přítomnost *Ureaplasma urealyticum*. Rozdílný výsledek mezi kultivací a setem se vyskytl u 15 (14,7 %) vzorků. 1 (6,7 %) vzorek byl kultivačně negativní, ale pozitivní na přítomnost *Ureaplasma urealyticum* v setu. Ve 14 (93,3 %) případech bylo *Ureaplasma urealyticum* prokázáno kultivačně, zatímco set podal výsledek negativní.

Přehled porovnání výsledků kultivační metody a komerčního setu pro průkaz *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* je znázorněn v tabulce IV a V.

Tabulka IV: Průkaz *Mycoplasma hominis* kultivační metodou a komerčním setem

MYCOPLASMA SYSTEM Plus

Shodný výsledek setu a kultivace	96 (94,1 %) vzorků	z toho	93 (96,9 %) vzorků negativních 3 (3,1 %) vzorky pozitivní
Odlišný výsledek setu a kultivace	6 (5,9 %) vzorků	z toho	4 (66,7 %) vzorky negativní v kultivaci, pozitivní v setu 2 (33,3 %) vzorky pozitivní v kultivaci, negativní v setu

Tabulka V: Průkaz *Ureaplasma urealyticum* kultivační metodou a komerčním setem

MYCOPLASMA SYSTEM Plus

Shodný výsledek setu a kultivace	87 (85,3 %) vzorků	z toho	60 (69 %) vzorků negativních 27 (31 %) vzorků pozitivních
Odlišný výsledek setu a kultivace	15 (14,7 %) vzorků	z toho	1 (6,7 %) vzorek negativní v kultivaci, pozitivní v setu 14 (93,3 %) vzorků pozitivních v kultivaci, negativních v setu

Z celkového počtu 102 vyšetřených vzorků bylo 77 (75,5 %) vzorků získáno stěrem z děložního krčku žen a 25 (24,5 %) vzorků výtěrem uretry mužů. Výskyt *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* ve vztahu k pohlaví je zaznamenán v tabulce VI a VII.

Mycoplasma hominis bylo diagnostikováno u 2,6 % žen a 12 % mužů. Přítomnost *Ureaplasma urealyticum* byla prokázána u 46,8 % žen a 20 % mužů. U obou pohlaví byly vzorky pozitivní na *Mycoplasma hominis* současně pozitivní na *Ureaplasma urealyticum*.

Tabulka VI: Výskyt *Mycoplasma hominis* ve vztahu k pohlaví

Pohlaví	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
Ženy	77	2	2,6
Muži	25	3	12,0
Celkem	102	5	

Tabulka VII: Výskyt *Ureaplasma urealyticum* ve vztahu k pohlaví

Pohlaví	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
Ženy	77	36	46,8
Muži	25	5	20,0
Celkem	102	41	

Dle věku byli pacienti rozděleni do 5 kategorií. Frekvence výskytu *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* v jednotlivých věkových skupinách pro ženy a muže jsou uvedeny v tabulkách VIII až XI. Výskyt *Mycoplasma hominis* u žen byl zaznamenán pouze ve věkové kategorii 17 – 20 let (22,2 %). *Ureaplasma urealyticum* bylo s nejvyšší frekvencí (77,8 %) izolováno ve stejné věkové kategorii žen. U mužů byl nejvyšší výskyt obou mikroorganismů pozorován ve věkové kategorii 31 – 40 let (*Mycoplasma hominis* ve 20 %, *Ureaplasma urealyticum* ve 40 %).

Tabulka VIII: Výskyt *Mycoplasma hominis* u žen ve vztahu k věku

Věk	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
17 – 20 let	9	2	22,2
21 – 30 let	28	0	0
31 – 40 let	29	0	0
41 – 50 let	6	0	0
51 let a více	5	0	0
Celkem	77	2	

Tabulka IX: Výskyt *Ureaplasma urealyticum* u žen ve vztahu k věku

Věk	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
17 – 20 let	9	7	77,8
21 – 30 let	28	13	46,4
31 – 40 let	29	10	34,5
41 – 50 let	6	4	66,7
51 let a více	5	2	40,0
Celkem	77	36	

Tabulka X: Výskyt *Mycoplasma hominis* u mužů ve vztahu k věku

Věk	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
18 – 20 let	1	0	0
21 – 30 let	8	1	12,5
31 – 40 let	5	1	20,0
41 – 50 let	5	0	0
51 let a více	6	1	16,7
Celkem	25	3	

Tabulka XI: Výskyt *Ureaplasma urealyticum* u mužů ve vztahu k věku

Věk	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
17 – 20 let	1	0	0
21 – 30 let	8	2	25,0
31 – 40 let	5	2	40,0
41 – 50 let	5	0	0
51 let a více	6	1	16,7
Celkem	25	5	

Dle diagnózy byly ženy rozděleny do 3 skupin:

- skupinu tvořily ženy se zánětlivými změnami pohlavní a močové soustavy, jejichž diagnózy byly:
 - zánětlivé nemoci hrdla děložního (N72)
 - akutní zánět pochvy – vaginitis acuta (N760)
 - subakutní a chronická vaginitida (N761)
 - jiné určené záněty pochvy a vulvy (N768)
 - pánevní zánětlivé nemoci u žen, NS (N739)
 - cystitida, NS (N309)
 - nespecifická uretritida (N341).

2. skupinu představovaly ženy s prekancerózami, s diagnózou:
 - dysplazie cervixu dělohy, NS (N879).
3. skupina zahrnovala ženy s ostatními klinickými symptomy:
 - eroze a ektropium cervixu dělohy a ectopia cervicis uteri (N86)
 - nezářlivá onemocnění cervixu dělohy, NS (N889)
 - nepravidelná menstruace, NS (N926)
 - nadměrná a častá menstruace s nepravidelným cyklem (N921)
 - jiné určené stavy sdružené s ženskými pohlavními orgány a menstruačním cyklem (N948)
 - neurčené stavy sdružené s ženskými pohlavními orgány a menstruačním cyklem (N949)
 - pánevní a perineální bolest (R102)
 - jiná a neurčená břišní bolest (R104)
 - gynekologické vyšetření (všeobecné) (Z014)
 - dohled nad lékovou antikoncepcí (Z304).

Výskyt sledovaných bakterií v jednotlivých skupinách diagnóz u žen ukazují tabulky XII a XIII. Nejvyšší frekvence výskytu *Mycoplasma hominis* (25 %) byla zaznamenána u žen s prekancerózami (v této skupině byly ale vyšetřeny pouze 4 pacientky), *Ureaplasma urealyticum* (54,2 %) u žen se zánětlivými změnami pohlavní a močové soustavy.

Tabulka XII: Výskyt *Mycoplasma hominis* u žen ve vztahu k diagnóze

Diagnóza	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
Zánětlivé změny pohlavní a močové soustavy	48	1	2,1
Prekancerózy	4	1	25
Ostatní klinické symptomy	25	0	0
Celkem	77	2	

Tabulka XIII: Výskyt *Ureaplasma urealyticum* u žen ve vztahu k diagnóze

Diagnóza	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
Zánětlivé změny pohlavní a močové soustavy	48	26	54,2
Prekancerózy	4	1	25
Ostatní klinické symptomy	25	9	36
Celkem	77	36	

Muži byli dle diagnózy rozděleni do 2 skupin:

- skupinu tvořili muži se zánětlivými změnami močové a pohlavní soustavy s diagnózami:
 - cystitida, NS (N309)
 - nespecifická uretritida (N341)
 - zánětlivé nemoci prostaty, NS (N419)
 - chlamydiové infekce dolního pohlavního a močového ústrojí (A560).
- skupina představovala muže s ostatními klinickými symptomy:
 - CR(E)ST syndrom (M341).

O frekvenci výskytu mykoplazmat a ureaplazmat u mužů dle diagnózy informují tabulky XIV a XV. Z nich lze pozorovat nejvyšší výskyt *Mycoplasma hominis* (100 %) i *Ureaplasma urealyticum* (100 %) u mužů s ostatními klinickými symptomy. Do této skupiny byl však zařazen pouze 1 pacient. U mužů se zánětlivými změnami pohlavní a močové soustavy se *Mycoplasma hominis* vyskytovalo v 8,3 % a *Ureaplasma urealyticum* v 16,7 %.

Tabulka XIV: Výskyt *Mycoplasma hominis* u mužů ve vztahu k diagnóze

Diagnóza	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
Zánětlivé změny pohlavní a močové soustavy	24	2	8,3
Ostatní klinické symptomy	1	1	100
Celkem	25	3	

Tabulka XV: Výskyt *Ureaplasma urealyticum* u mužů ve vztahu k diagnóze

Diagnóza	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
Zánětlivé změny pohlavní a močové soustavy	24	4	16,7
Ostatní klinické symptomy	1	1	100
Celkem	25	5	

Výskyt *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* ve vztahu k používané antikoncepci žen je shrnut v tabulkách XVI a XVII. *Mycoplasma hominis* bylo izolováno pouze u žen, které užívaly hormonální antikoncepci a to v 5,3 %. Nejvyšší frekvence výskytu *Ureaplasma urealyticum* byla u žen po hysterektomii (100 %). Jedná se ale o skupinu pouze se 2 pacientkami. U žen užívajících hormonální antikoncepci se *Ureaplasma urealyticum* vyskytovalo v 55,3 %, u žen s nitroděložním tělískem v 50 % a u žen bez antikoncepce v 37,9 %. U jedné pacientky nebyla informace o používané antikoncepci dostupná.

Tabulka XVI: Výskyt *Mycoplasma hominis* u žen ve vztahu k používané antikoncepci

Antikoncepce	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
Hormonální	38	2	5,3
Nitroděložní tělísko	6	0	0
Hysterektomie	2	0	0
Bez antikoncepce	29	0	0
Není informace	1	0	0
Celkem	77	2	

Tabulka XVII: Výskyt *Ureaplasma urealyticum* u žen ve vztahu k používané antikoncepci

Antikoncepce	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
Hormonální	38	21	55,3
Nitroděložní tělísko	6	3	50
Hysterektomie	2	2	100
Bez antikoncepce	29	11	37,9
Není informace	1	0	0
Celkem	77	36	

Při zjišťování přítomnosti kontaminující mikroflóry nebyl zaznamenán žádný výskyt u testování setem MYCOPLASMA SYSTEM Plus. Z PPLO bujónu byly izolovány nejčastěji kvasinky a *Escherichia coli*, dále *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis* (viz. tabulky XVIII a XIX).

Tabulka XVIII: Výskyt kontaminující mikroflóry v PPLO bujónu pro kultivaci *Mycoplasma hominis*

Kontaminující mikroorganismus	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
<i>Escherichia coli</i>	7	1	14,3
<i>Streptococcus agalactiae</i>	7	2	28,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	1	14,3
<i>Enterococcus faecalis</i>	7	1	14,3

Tabulka XIX: Výskyt kontaminující mikroflóry v PPLO bujónu pro kultivaci *Ureaplasma urealyticum*

Kontaminující mikroorganismus	Počet vyšetřených vzorků	Z toho	
		pozitivních vzorků	%
kvasinky	41	11	26,8
<i>Escherichia coli</i>	41	4	9,8

5. DISKUZE A ZÁVĚR

Mycoplasma hominis a *Ureaplasma urealyticum* jsou běžnou součástí mikroflóry urogenitálního systému zdravého člověka. Ve větším počtu jsou izolovány u pacientů s některými onemocněními urogenitálního traktu. Je prokázán jejich význam při bakteriální vaginóze, uretritidách, pyelonefritidách, epidydimiditidách, salpingitidách, při komplikacích v těhotenství. Míra patogenity těchto mikroorganismů však stále není přesně objasněna.

Pro vyšetření přítomnosti mykoplazmat a ureaplazmat byly použity vzorky získané stěrem z krčku děložního žen a výtěrem uretry mužů. K odběru byly použity komerčně dodávané sterilní vatové tampóny, které byly do zpracování vzorku uchovány v transportním médiu. Tento postup se shoduje s doporučením Bučka et al. (1989).

Ihned po přijetí do laboratoře byly vzorky zpracovány souběžně konvenční kultivační metodou a komerčním setem MYCOPLASMA SYSTEM Plus.

Kultivační média používaná při zpracování této studie byla připravována v laboratoři z jednotlivých komponent a redestilované vody. Tekuté půdy obsahovaly PPLO broth, koňské sérum a kvasnicový extrakt. Koňské sérum je zdrojem cholesterolu nezbytného pro růst urogenitálních mykoplazmat a ureaplazmat, kvasnicový extrakt obsahuje další růstové faktory (Quinn et al., 1994). Dalšími komponentami jsou substráty arginin (pro *Mycoplasma hominis*) nebo urea (pro *Ureaplasma urealyticum*) a acidobazický indikátor fenolová červeň. Taylor-Robinson a Furr (1981) uvádí navíc přídavek glukózy. Pro inhibici růstu ostatních bakterií urogenitálního traktu byl přidáván ampicilin (do půd pro kultivaci *Mycoplasma hominis* i *Ureaplasma urealyticum*) a linkomycin (do půd pro kultivaci *Ureaplasma urealyticum*). Použití těchto antibiotik doporučují Clegg et al. (1997) a Příbylová (1999). I když Taylor-Robinson (1999) uvádí citlivost *Mycoplasma hominis* k thaliu, je do médií pro kultivaci tohoto druhu přidáván inhibitor octan thallný. Cimolai (2001) a Quinn et al. (1994) zmiňují citlivost k thaliu pouze u *Ureaplasma urealyticum*. Základem pevných půd byl PPLO agar doplněný koňským sérem, kvasnicovým extraktem a ampicilinem. Pro kultivaci *Mycoplasma hominis* byl přidáván octan thallný, pro kultivaci *Ureaplasma urealyticum* urea, fenolová červeň, linkomycin a síran manganatý. Kolonie ureaplazmat jsou velmi malé, síran manganatý je zbarvuje do hněda a usnadňuje tak jejich

pozorovatelnost (Taylor-Robinson a Furr, 1981). pH kultivačních médií pro *Mycoplasma hominis* bývá upravováno na hodnotu 7,2 až 7,8. *Ureaplasma urealyticum* vyžaduje pH nižší, okolo 6,0 (Cimolai, 2001, Quinn et al., 1994).

Do 2 ml PPLO bujónu bylo inokulováno 0,2 ml vzorku v transportním médiu. Clegg et al. (1997) a Keane et al. (2000) přidávali 0,2 ml vzorku do 1,8 ml kultivačního média. Inkubace probíhala v anaerostatu při 37 °C po dobu 24 až 48 hod. Během této doby byla pozorována barevná změna média. Vzorky pozitivní v bujónu byly očkovány mikropipetou na PPLO agar. 10 µl vzorku pomnoženého v PPLO bujónu bylo přeneseno na povrch agaru, který byl v místě nánosu mírně poškozen vpichem špičky pipety. Očkování pevných půd přímo odběrovým tampónem nebo rozlitím malého množství vzorku pomnoženého v tekutém médiu na povrch agaru uvádí Clegg et al. (1997) a Unzeitig et al. (1990). PPLO agar byl poté inkubován v anaerostatu při 37 °C po dobu 3 až 7 dnů. Pod mikroskopem byl při 200 násobném zvětšení hodnocen nárůst charakteristických kolonií mykoplazmat. Inkubace probíhá běžně v anaerobních podmínkách při 37 °C. Doba inkubace tekutých médií je uváděna v rozmezí 24 hod. až 8 dnů, u agarových půd 48 hod. až 8 dnů (Arya et al., 2001, Quinn et al., 1994, Unzeitig et al., 1990).

Komerčně vyráběné sety pro diagnostiku mykoplazmat jsou také založeny na kultivaci vzorku v médiu určitého složení. Toto složení však není zveřejňováno. Princip detekce opět spočívá v hydrolýze příslušného substrátu a změně pH média v jamce testu. Anaerobní prostředí bývá zajištěno zakápnutím obsahu jamek vazelinovým nebo parafinovým olejem. Inkubace probíhá 24 až 48 hod. (Cunha et al., 1998, Evans et al., 2007).

Zpracování vzorku komerčním setem MYCOPLASMA SYSTEM Plus bylo prováděno dle pokynů výrobce. Vzorek v transportním bujónu pro mykoplazmata byl nejprve protřepán pomocí orbitální třepačky. 1 ml tohoto transportního bujónu se vzorkem byl přidán do ampulky s fyziologickým roztokem, obsah byl protřepán a ponechán 5 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo přeneseno 0,2 ml (4 kapky) suspenze vzorku do každé z jamek testu. Všechny jamky s výjimkou jamky 6-TR/YE byly zakapány 3 kapkami parafinového oleje, celý systém byl přikryt víkem a inkubován v inkubátoru při 37 °C po dobu 24 až 48 hod. Po inkubaci byla pozorována barevná změna v jamkách 1-GR+ až 5-UR.

Celkem bylo vyšetřeno 102 vzorků. Z uvedeného počtu bylo 5 (4,9 %) vzorků s pozitivním kultivačním nálezem na *Mycoplasma hominis* a 41 (40,2 %) na *Ureaplasma urealyticum*. Výsledky byly porovnány s výsledky komerčního setu MYCOPLASMA SYSTEM Plus a hodnoceny ve vztahu k pohlaví, věku, diagnóze a používané antikoncepci u žen.

Při průkazu *Mycoplasma hominis* podalo vyšetření kultivační metodou a komerčním setem shodné výsledky u 96 (94,1 %) vzorků. Z toho 93 (96,9 %) vzorků bylo negativních a 3 (3,1 %) vzorky pozitivní na přítomnost *Mycoplasma hominis*. Výsledek setu a kultivační metody se lišil u 6 (5,9 %) vzorků. 4 (66,7 %) vzorky byly kultivačně negativní, zatímco set prokázal přítomnost *Mycoplasma hominis*. U 2 (33,3 %) vzorků byl pozitivní průkaz přítomnosti *Mycoplasma hominis* v kultivaci, přičemž set byl negativní.

Výsledky průkazu *Ureaplasma urealyticum* kultivační metodou a komerčním setem se shodovaly u 87 (85,3 %) vzorků. Z toho 60 (69 %) vzorků bylo negativních a 27 (31 %) pozitivních na přítomnost *Ureaplasma urealyticum*. Rozdílný výsledek mezi kultivací a setem se vyskytl u 15 (14,7 %) vzorků. 1 (6,7 %) vzorek byl kultivačně negativní, ale pozitivní na přítomnost *Ureaplasma urealyticum* v setu. Ve 14 (93,3 %) případech bylo *Ureaplasma urealyticum* prokázáno kultivačně, zatímco set podal výsledek negativní.

Komerční set MYCOPLASMA SYSTEM Plus nebyl dosud v literatuře testován.

Výsledky průkazu mykoplazmat ve vaginálních stěrech 100 náhodně vybraných žen získané kultivační metodou v bujónu a na A7 agaru a kitem Mycoplasma IST porovnávali Clegg et al. (1997). *Mycoplasma hominis* nebylo prokázáno na A7 agaru ani v kitu u 25 (25 %) vzorků. Ze 65 (65 %) vzorků bylo vyizolováno oběma metodami. Ze zbylých 10 (10 %) vzorků bylo u 5 (50 %) vzorků *Mycoplasma hominis* kultivačně prokázáno, v kitu byly ale tyto vzorky negativní. 5 (50 %) vzorků bylo naopak negativních v kultivaci a pozitivních v kitu. Při průkazu *Ureaplasma urealyticum* bylo 15 (15 %) vzorků negativních a 76 (76 %) vzorků pozitivních oběma metodami. Výsledek vyšetření se lišil u 9 (9 %) vzorků. 2 (22,2 %) vzorky byly kultivačně pozitivní, ale Mycoplasma IST přítomnost ureaplazmat neprokázalo. U 7 (77,8 %) vzorků byl negativní kultivační výsledek, v kitu byla izolace pozitivní. Dle autorů mohla být příčinou negativity kultivačního vyšetření kontaminace vzorku jinými

mikroorganismy, které i přes přítomnost inhibitorů přerostly kultivační agar a vzorek byl považován za negativní na přítomnost mykoplazmat.

Evans et al. (2007) provedli ve své studii srovnání kitu Mycoplasma Duo a konvenční kultivační metody na A7 agaru pro průkaz genitálních mykoplazmat. Kit Mycoplasma Duo ukázal vyšší stupeň detekce než kultivace. Ze 191 vyšetřených vzorků bylo 91 (48 %) negativních v kitu i kultivaci, 100 (52 %) bylo pozitivních v kitu, pouze 68 (36 %) vzorků bylo kultivačně pozitivních. Mycoplasma Duo kit přitom detekoval všechny kultivačně pozitivní vzorky. Autoři zmiňují stejný problém s kontaminující mikroflórou ve vzorcích jako Clegg et al. (1997).

Problémy s kontaminující mikroflórou při vyhodnocení výsledků zmiňované v pracích Clegg et al. (1997) a Evans et al. (2007) byly řešeny zjišťováním přítomnosti kontaminace při pozitivitě vzorku v PPLO bujónu a/nebo v jamce setu MYCOPLASMA SYSTEM Plus a posouzením její schopnosti hydrolyzovat arginin nebo ureu.

Při zjišťování přítomnosti kontaminující mikroflóry nebyl zaznamenán žádný výskyt u testování setem MYCOPLASMA SYSTEM Plus. Z PPLO bujónu byly izolovány nejčastěji kvasinky a *Escherichia coli*, dále *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*. V případě zjištění dalších mikroorganismů se schopností hydrolyzovat příslušný substrát a nepřítomnosti charakteristických kolonií mykoplazmat na PPLO agaru byl vzorek označen za negativní na přítomnost mykoplazmat nebo ureaplazmat.

Z celkového počtu 102 vyšetřených vzorků bylo 77 (75,5 %) vzorků získáno stěrem z děložního krčku žen a 25 (24,5 %) vzorků výtěrem uretry mužů.

Mycoplasma hominis bylo diagnostikováno u 2,6 % žen a 12 % mužů. Přítomnost *Ureaplasma urealyticum* byla prokázána u 46,8 % žen a 20 % mužů. U obou pohlaví byly vzorky pozitivní na *Mycoplasma hominis* současně pozitivní na *Ureaplasma urealyticum*.

Koch et al. (1997) uvádí vyšší výskyt *Mycoplasma hominis* u žen (6,8 %) než u mužů (3,3 %). *Ureaplasma urealyticum* bylo v jejich práci izolováno u 32,4 % žen a 12 % mužů.

Téměř ve všech pracích byl zjištěn vyšší výskyt *Mycoplasma hominis* u žen než v této studii. Guven et al. (2005) prokázali tento druh u 0,9 %, Cedillo-Ramírez et al.

(2000) u 5 %, Stojanova et al. (2003) u 10,6 % a Unzeitig et al. (1990) u 34,6 % vyšetřených žen. *Ureaplasma urealyticum* diagnostikovali tito autoři (ve stejném pořadí) u 11,8 %, 28 %, 31,7 % a 64,7 % vyšetřených žen.

Jedna z mála prací zabývající se výskytem mykoplazmat u mužů (Zambor et al., 1990) uvádí vyšší frekvenci nálezu *Mycoplasma hominis* (16,2 %) a *Ureaplasma urealyticum* (43,4 %).

Dle věku byli pacienti rozděleni do 5 kategorií. Výskyt *Mycoplasma hominis* u žen byl zaznamenán pouze ve věkové kategorii 17 – 20 let (22,2 %). *Ureaplasma urealyticum* bylo s nejvyšší frekvencí (77,8 %) izolováno ve stejné věkové kategorii žen. U mužů byl nejvyšší výskyt obou mikroorganismů pozorován ve věkové kategorii 31 – 40 let (*Mycoplasma hominis* ve 20 %, *Ureaplasma urealyticum* ve 40 %).

Unzeitig et al. (1990) zjistili nejvyšší záchytnost *Mycoplasma hominis* u žen mezi 31. – 40. rokem (41,6 %) a u žen do 20 let (36,2 %). Výskyt *Ureaplasma urealyticum* dle jejich studie klesá s věkem vyšetřovaných žen – ve skupině žen do 20 let činí 72,3 %, u žen starších 50 let pouze 46,3 %. Ve studii Cedillo-Ramírez et al. (2000) byl zaznamenán nejvyšší výskyt *Mycoplasma hominis* i *Ureaplasma urealyticum* u žen ve věku 19 – 29 let.

Vztah frekvence výskytu urogenitálních mykoplazmat k věku vyšetřovaných mužů nebyl v dostupných pracích studován.

Dle diagnózy byly ženy rozděleny do 3 skupin: ženy se zánětlivými změnami pohlavní a močové soustavy, ženy s prekancerózami a ženy s ostatními klinickými symptomy. Nejvyšší frekvence výskytu *Mycoplasma hominis* (25 %) byla zaznamenána u žen s prekancerózami. V této skupině byly ale vyšetřeny pouze 4 pacientky. U žen se zánětlivými změnami pohlavní a močové soustavy byl tento druh izolován ve 2,1 % případů. *Ureaplasma urealyticum* se vyskytovalo s nejvyšší frekvencí (54,2 %) u žen se zánětlivými změnami pohlavní a močové soustavy, dále u žen s ostatními klinickými symptomy ve 36 % a ve skupině žen s prekancerózami ve 25 % vyšetřených vzorků.

Muži byli dle diagnózy rozděleni do 2 skupin: muži se zánětlivými změnami močové a pohlavní soustavy a muži s ostatními klinickými symptomy. Nejvyšší výskyt *Mycoplasma hominis* (100 %) i *Ureaplasma urealyticum* (100 %) byl pozorován u mužů s ostatními klinickými symptomy. Do této skupiny byl však zařazen pouze 1

pacient. U mužů se zánětlivými změnami pohlavní a močové soustavy se *Mycoplasma hominis* vyskytovalo v 8,3 % a *Ureaplasma urealyticum* v 16,7 %.

Studii ve skupině 43 mužů a 7 žen s negonokokovou uretritidou provedli Kiliç et al. (2004). *Ureaplasma urealyticum* vyizolovali u 48 % a *Mycoplasma hominis* u 16 % pacientů bez ohledu na pohlaví.

Buček et al. (1989) uvádí nález *Mycoplasma hominis* u 21,3 % a *Ureaplasma urealyticum* u 57,3 % žen s vaginitidou a výtokem. U žen s ostatními klinickými symptomy byla mykoplazmata izolována u 32,1 % a 66,9 % (v tomtéž pořadí). Přítomnost *Mycoplasma hominis* u 17 % a *Ureaplasma urealyticum* u 52 % žen s nespecifickou vaginitidou prokázali Cedillo-Ramírez et al. (2000). Keane et al. (2000) detekovali *Mycoplasma hominis* u 53 % a *Ureaplasma urealyticum* u 65 % žen s bakteriální vaginózou. *Mycoplasma hominis* bylo jako jediné mykoplazma prokazováno významně častěji u žen s bakteriální vaginózou než u žen bez této diagnózy.

Mycoplasma hominis ve 12,3 % a *Ureaplasma urealyticum* ve 43,9 % vzorcích mužů s kombinovanou gonokokovou uretritidou a v 19,4 % a 38,7 % (ve stejném pořadí) vzorcích mužů s negonokokovou uretritidou diagnostikovali Zambor et al. (1990).

Výskyt *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* byl hodnocen ve vztahu k používané antikoncepci žen. *Mycoplasma hominis* bylo izolováno pouze u žen, které užívaly hormonální antikoncepci a to v 5,3 %. Nejvyšší frekvence výskytu *Ureaplasma urealyticum* byla u žen po hysterektomii (100 %). Jedná se ale o skupinu pouze se 2 pacientkami. U žen užívajících hormonální antikoncepci se *Ureaplasma urealyticum* vyskytovalo v 55,3 %, u žen s nitroděložním tělískem v 50 % a u žen bez antikoncepce v 37,9 %. U jedné pacientky nebyla informace o používané antikoncepci dostupná.

Güven et al. (2005) prokázali přítomnost *Mycoplasma hominis* u 2,5 % žen s nitroděložním tělískem a u 0,8 % žen nepoužívajících žádnou antikoncepci. *Ureaplasma urealyticum* se vyskytovalo u 16,5 % žen s nitroděložním tělískem, u 12,9 % žen bez antikoncepce a u 5,9 % žen užívajících hormonální antikoncepci. U žen používajících kondom nebyl výskyt mykoplazmat zaznamenán. *Mycoplasma hominis* jako součást infekce rány po hysterektomii bylo diagnostikováno u 5,7 % žen po tomto chirurgickém zákroku (Miranda et al., 1993).

Mycoplasma hominis a *Ureaplasma urealyticum* lze ve vzorcích z urogenitálního traktu prokazovat jak konvenční kultivační metodou tak komerčně dodávanými sety. Kultivační metoda využívající PPLO půd je náročnější a zdlouhavá. Výhodami komerčního setu MYCOPLASMA SYSTEM Plus jsou jednoduchost provedení, detekce mykoplazmat do 48 hod. a možnost souběžně s vyšetřením testovat citlivost mykoplazmat na řadu antibiotik.

Pro posouzení správnosti výsledků použitých metod bych doporučila provádět současně s kultivačními vyšetřeními molekulárně biologické vyšetření vzorků metodou PCR.

6. PŘÍLOHY

Příloha 1: Set MYCOPLASMA SYSTEM Plus



Příloha 2: Set MYCOPLASMA SYSTEM Plus s pozitivním průkazem

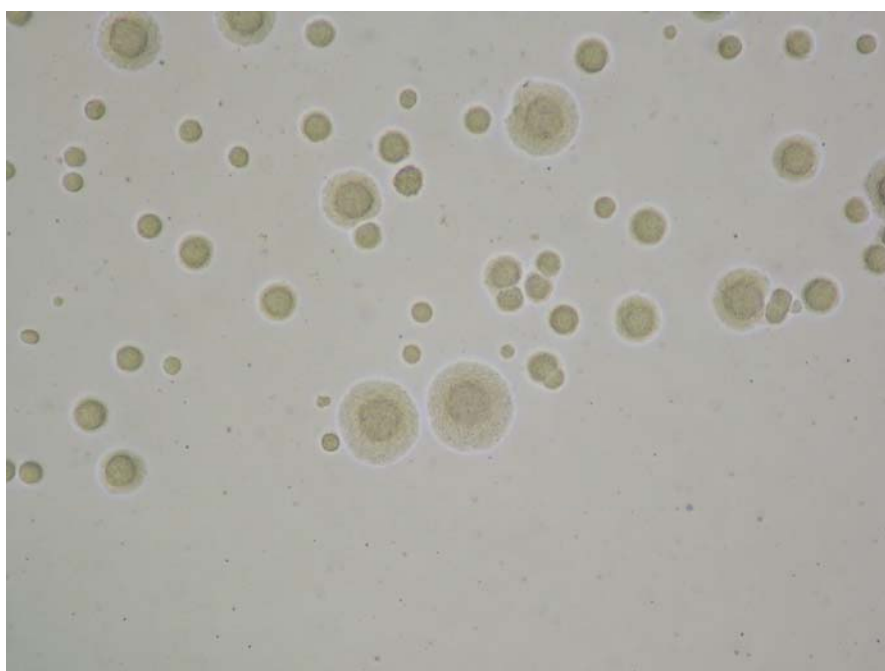
Ureaplasma urealyticum



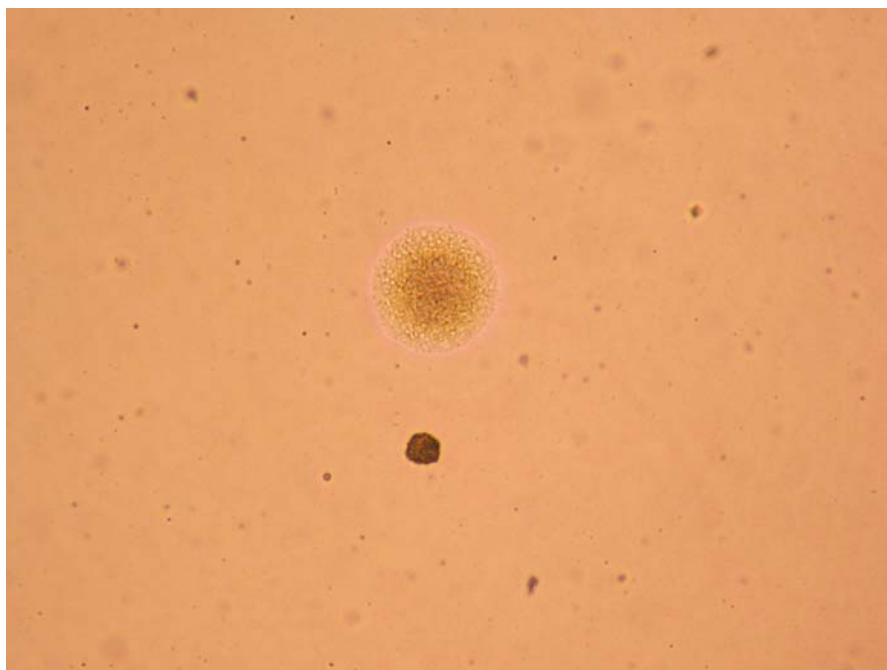
Příloha 3: Růst *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* v PPLO bujónu



Příloha 4: Kolonie *Mycoplasma hominis* s charakteristickým vzhledem „sázeného vejce“ na PPLO agaru (zvětšení 200x)



Příloha 5: Kolonie *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* na PPLO agaru (zvětšení 200x)



7. SEZNAM LITERATURY

ARYA, O. P. – TONG, C. Y. W. – HART, C. A. – PRATT, B. C. – HUGHES, S. – ROBERTS, P. – KIRBY, P. – HOWEL, J. – MCCORMICK, A. – GODDARD, A. D. Is *Mycoplasma hominis* a vaginal pathogen?. *Sexually Transmitted Infections*, 2001, vol. 77, s. 58-62.

BACZYNSKA, A. – FUNCH, P. – FEDDER, J. – KNUDSEN, H. J. – BIRKELUND, S. – CHRISTIANSEN, G. Morphology of human fallopian tubes after infection with *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* – in vitro organ culture study. *Human Reproduction*, 2007, vol. 22, no. 4, s. 968-979.

BEDNÁŘ, M. – SOUČEK, A. – VÁVRA, J. *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. 1. vyd. Praha: Triton, 1994. 226 s. ISBN 80-901521-4-7.

BEDNÁŘ, M. – FRAŇKOVÁ, V. – SCHINDLER, J. – SOUČEK, A. – VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996. 558 s. ISBN 80-238-0297-6.

BRAUN, P. – LEE, Y.-H. – KLEIN, J. O. – MARCY, S. M. – KLEIN, T. A. – CHARLES, D. – LEVY, P. – KASS, E. H. Birth weight and genital mycoplasmas in pregnancy. *The New England Journal of Medicine*, 1971, vol. 284, no. 4, s. 167-171.

BRECKWOLDT, M. – FABELOVÁ, G. – MARTIUS, G. – MARTIUS, J. – PFLEIDERER, A. – SCHNELDER, H. *Gynekologie a porodnictví*. Martin: Osveta, 1997. ISBN 80-88824-56-7.

BRUNNER, H. – WEIDNER, W. – SCHIEFER, H.-G. Studies on the role of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in prostatitis. *The Journal of Infectious Diseases*, 1983, vol. 147, no. 5, s. 807-813.

BUČEK, R. – UNZEITIG, V. – OBDRŽÁLEK, V. Izolace mykoplazmat z genitálu žen. *Československá epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*, 1989, roč. 38, č. 6, s. 330-336.

CASSELL, G. H. – WAITES, K. B. – CROUSE, D. T. Perinatal mycoplasmal infections. *Clinics in Perinatology*, 1991, vol. 18, no. 2, s. 241-261.

CEDILLO-RAMÍREZ, L. – GIL, C. – ZAGO, Y. – YÁÑEZ, A. – GIONO, S. Association of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* with some indicators of nonspecific vaginitis. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 2000, vol. 42, s. 1-6.

CIMOLAI, N. *Laboratory diagnosis of bacterial infections*. New York: Marcel Dekker, 2001. 936 s. ISBN 0-8247-0589-0.

CLEGG, A. – PASSEY, M. – YOANNES, M. – MICHAEL, A. High rates of genital mycoplasma infection in the highlands of Papua New Guinea determined both by culture and by commercial detection kit. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, vol. 35, no. 1, s. 197-200.

CUMMINGS, M.C. – MCCORMACK, W.M. Increase in resistance of *Mycoplasma hominis* to tetracyclines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1990, vol. 34, no. 12, s. 2297-2299.

CUNHA, R. A. F. – TAKE, K. – VAZ, A. J. – ROSENTHAL, C. Detection of mycoplasmas in urethral swabs from HIV-1 infected patients and control individuals using culture techniques and polymerase chain reaction. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 1998, vol. 40, no. 1, s. 1-5.

CHUA, K. B. – NGEOW, Y. F. – NG, K. B. – CHYE, J. K. – LIM, C. T. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* isolation from cervical secretions of pregnant women and nasopharyngeal secretions of their babies at delivery. *Singapore Medical Journal*, 1998, vol. 39, no. 7, s. 300-302.

CHUA, K. B. – NGEOW, Y. F. – LIM, C. T. – NG, K. B. – CHYE, J. K. Colonization and transmission of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* from mothers to full and preterm babies by normal vaginal delivery. *Medical Journal of Malaysia*, 1999, vol. 54, no. 2, s. 242-246.

DAYAN, L. Pelvic inflammatory disease. *Australian Family Physician*, 2006, vol. 35, no. 11, s. 858-862.

DEL GIUDICE, R. A. – ROBILLARD, N. F. – CARSKI, T. R. Immunofluorescence identification of *Mycoplasma* on agar by use of incident illumination. *Journal of Bacteriology*, 1967, vol. 93, no. 4, s. 1205-1209.

DONDERS, G. G. - VAN BULCK, B. – CAUDRON, J. – LONDERS, L. – VEREECKEN, A. – SPITZ, B. Relationship of bacterial vaginosis and mycoplasmas to the risk of spontaneous abortion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2000, vol. 183, no. 2, s. 431-437.

ELSHIBLY, S. – KALLINGS, I. – HELLBERG, D. – MARDH, P. A. Sexual risk behaviour in women carriers of *Mycoplasma hominis*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1996, vol. 103, no. 11, s. 1124-1128.

EVANS, G. E. – ANDERSON, T. P. – SEAWARD, L. M. – MURDOCH, D. R. Evaluation of the Mycoplasma Duo kit for the detection of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* from urogenital and placental specimens. *British Journal of Biomedical Science*, 2007, vol. 64, no. 2, s. 66 – 69.

FOY, H. M. – KENNY, G. E. – WENTWORTH, B. B. – JOHNSON, W. L. – GRAYSTON, J. T. Isolation of *Mycoplasma hominis*, T-strains, and cytomegalovirus from the cervix of pregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1970, vol. 106, no. 5, s. 635-643.

GARCÍA, C. – UGALDE, E. – MONTEAGUDO, I. – SAEZ, A. – AGÜERO, J. – MARTINEZ-MARTINEZ, L. – MIÑAMBRES, E. Isolation of *Mycoplasma hominis* in critically ill patients with pulmonary infections: clinical and microbiological analysis in an intensive care unit. *Intensive Care Medicine*, 2007, vol. 33, s. 143-147.

GUVEN, M. A. – GUNYELI, I. – DOGAN, M. – CIRAGIL, P. – BAKARIS, S. – GUL, M. The demographic and behavioural profile of women with cervicitis infected with *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* and the comparison of two medical regimens. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, September 2005, vol. 272, no. 4, s. 197-200.

GUPTA, V. – DHAWAN, B. – KHANNA, N. – AGARWAL, N. – BHATTACHARYA, S. N. – SREENIVAS, V. – CHAUDHRY, R. Detection and biovar discrimination of *Ureaplasma urealyticum* in Indian patients with genital tract infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 2008, vol. 60, s. 95-97.

HÁJEK, Z. – MAŠATA, J. – ŠVIHOVEC, P. Skrínek vaginálních infekcí v těhotenství. *Časopis lékařů českých*, 2005, roč. 144, č. 11, s. 733-736.

HIRAI, Y. – KANATANI, T. – ONO, M. – MATSUSHITA, O. – KANEMASA, Y. An indirect Immunofluorescence method for detection of *Mycoplasma hominis* in vaginal smears. *Microbiology and Immunology*, 1991, vol. 35, no. 10, s. 831-839.

HOPKINS, P. M. – WINLAW, D. S. – CHHAJED, P. N. – HARKNESS, J. L. – HORTON, M. D. – KEOGH, A. M. – MALOUF, M. A. – GLANVILLE, A. R. *Mycoplasma hominis* infections in heart and lung transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2002, vol. 21, no. 11, s. 1225-1229.

KEANE, F. E. A. – THOMAS, B. J. – GILROY, C. B. – RENTON, A. – TAYLOR-ROBINSON, D. The association of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* with bacterial vaginosis: observations on heterosexual women and their male partners. *International Journal of STD and AIDS*, 2000, vol. 11, s. 356-360.

KILIÇ, D. – BAŞAR, M. M. – KAYGUSUZ, S. – YILMAZ, E. – BAŞAR, H. – BATISLAM, E. Prevalence and treatment of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Mycoplasma hominis* in patients with non-gonococcal urethritis. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2004, vol. 57, s. 17-20.

KOCH, A. – BILINA, A. – TEODOROWITZ, L. – STARY, A. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients with sexually transmitted diseases. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 1997, vol. 109, s. 584-589.

LADEFOGED, S. A. Molecular dissection of *Mycoplasma hominis*. *APMIS Supplement*, 2000, vol. 97, s. 1-45.

MACHADO, A. A. – ZORZI, A. R. – GLÉRIA, A. E. A. – DONADI, E. A. Frequency of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* infections in women with systemic lupus erythematosus. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, May/June 2001, vol. 34, no. 3, s. 243-247.

MADOFF, S. – HOOPER, D. C. Nongenitourinary infections caused by *Mycoplasma hominis* in adults. *Reviews of Infectious Diseases*, 1988, vol. 10, no. 3, s. 602-613.

MARDH, P. A. *Mycoplasma hominis* infections of the central nervous system in newborn infants. *Sexually Transmitted Infections*, 1983, vol. 10, s. 331-334.

MARDH, P. A. – ELSHIBLY, S. – KALLINGS, I. – HELLBERG, D. Vaginal flora changes associated with *Mycoplasma hominis*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1997, vol. 176, no. 1, s. 173-178.

MCAULIFFE, L. – ELLIS, R. J. – MILES, K. – AYLING, R. D. – NICHOLAS, R. A. J. Biofilm formation by mycoplasma species and its environmental persistence and survival. *Microbiology*, 2006, vol. 152, s. 913-922.

MELKOVÁ, R. Antigénový profil *Mycoplasma* species a jeho význam pre patogenitu. *Bulletin Československé společnosti mikrobiologické*, 2003, č. 4, s. 126-137.

MEYER, R. D. – CLOUGH, W. Extragenital *Mycoplasma hominis* infections in adults: emphasis on immunosuppression. *Clinical Infectious Diseases*, 1993, vol. 17, s. 243-249.

MIRANDA, C. – ALADOS, J. C. – MOLINA, J. M. – DOMINGUEZ, C. – PARTAL, Y. – MIRANDA, J. A. - DE LA ROSA, M. Posthysterectomy wound infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 1993, vol. 17, s. 41-44.

MURRAY, P. R. – DREW, W. L. – KOBAYASHI, G. S. – THOMPSON, J. H. *Medical microbiology*. Wolfe Publishing, International Student Edition, 1990. Kapitola 24, *Mycoplasma and Ureaplasma*, s. 249-254.

PARKER, M. T. – DUERDEN, B. J. *Systematic bacteriology*. Philadelphia: B. C. Decker, 1993. 709 s. ISBN 1-55664-290-3. Kapitola 2.33, The Mycoplasmatales, s. 664-681.

PŘIBYLOVÁ, M. Mykoplazmata vykazují nesporný patogenní potenciál. *Příloha Zdravotnických Novin, Lékařské listy*, 5.února 1999, roč. XLVIII, č. 5, s. 12.

QUINN, P. J. – CARTER, M. E. – MARKEY, B. K. – CARTER, G. R. *Clinical veterinary microbiology*. Wolfe Publishing, 1994. 684 s. ISBN 0-7234-1711-3. Kapitola 35, The Mycoplasmas (Class: Mollicutes), s. 320-326.

RAZIN, S. *Mycoplasmas*. [online]. Dostupné z: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch037.htm>. [cit. 2003-03-19].

RAZIN, S. – YOGEV, D. – NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, vol. 62, no. 4, s. 1094-1156.

SAMRA, Z. – ROSENBERG, S. – SOFFER, Y. In vitro susceptibility of *Mycoplasma hominis* clinical isolates to tetracyclines, quinolones and macrolides. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2002, vol. 44, no. 4, s. 359-361.

SCHAEVERBEKE, T. – RENAUDIN, H. – CLERC, M. – LEQUEN, L. – VERNHES, J. P. - DE BARBEYRAC, B. – BANNWARTH, B. – BEBEAR, C. – DEHAIS, J. Systematic detection of mycoplasmas by culture and polymerase chain reaction (PCR) procedures in 209 synovial fluid samples. *British Journal of Rheumatology*, 1997, vol. 36, no. 3, s. 310-314.

SOROKA, A. E. – MOMYNALIEV, K. T. – TARASKINA, A. M. – SAVICHEVA, A. M. – GOVORUN, V. M. Genetic heterogeneity of *Mycoplasma hominis* clinical isolates detected during observation of patients with recurrent urogenital inflammation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2001, vol. 32, no. 1, s. 663-665.

STOJANOVA, S. – PANOVSKA, M. – BOZINOVA, Z. – IVIC-KOLEVSKA, S. Frequency of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in females genital tract and their susceptibility to antimicrobial agents. *1st FEMS Congress*, Poster P6-19, 2003, s. 252.

TARASKINA, A. E. – SAVICHEVA, A. M. – AKOPIAN, T. A. – SOROKA, A. E. – MOMYNALIEV, K. T. – GOVORUN, V. M. Drift of *tetM* determinant in urogenital microbiocenosis containing mycoplasmas during treatment with a tetracycline antibiotic. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2002, no. 1, s. 60-63.

TAYLOR-ROBINSON, D. Mykoplazmata. In: GREENWOOD, D. – SLACK, R. C. B. – PEUTHERER, J. F. et al. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 1999. 686 s. ISBN 80-7169-365-0. Kapitola 42, s. 389-398.

TAYLOR-ROBINSON, D. – FURR, P. M. Recovery and identification of human genital tract mycoplasmas. *Israel Journal of Medical Sciences*, July 1981, vol. 17, no. 7, s. 648-653.

TAYLOR-ROBINSON, D. – FURR, P. M. Genital mycoplasma infections. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 1997, vol. 109, no. 14, s. 578-583.

TAYLOR-ROBINSON, D. – FURR, P. M. – HANNA, N. F. Microbiological and serological study of non-gonococcal urethritis with special reference to *Mycoplasma genitalium*. *Genitourinary Medicine*, 1985, vol. 61, s. 319-324.

TAYLOR-ROBINSON, D. – MCCORMACK, W.M. The genital mycoplasmas. *The New England Journal of Medicine*, 1980, vol. 302, no. 18, s. 1003-1010.

TAYLOR-ROBINSON, D. – ROSENSTEIN, I. Vaginal flora changes associated with *Mycoplasma hominis*. (komentář k článku Mardh et al., 1997). *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1998, vol. 178, no. 2, s. 415.

TAYLOR-ROBINSON, D. – ROSENSTEIN, I. Is *Mycoplasma hominis* a vaginal pathogen?. (komentář k článku Arya et al., 2001). *Sexually Transmitted Infections*, August 2001, vol. 77, no. 4, s. 302.

TULLY, J. G. Mollicute-Host Interrelationships: Current concepts and diagnostic implications. In: TULLY, J. G. – RAZIN, S. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. Vol. II Diagnostic procedures*. San Diego: Academic press, 1996. 462 s. ISBN 0-12-583806-9. S. 1-21.

UNZEITIG, V. – BUČEK, R. – BLÁHA, O. Epidemiologie vaginálních mykoplazmat. *Československá gynekologie*, květen 1990, roč. 55, č. 4, s. 241-246.

UPADHYAYA, M. – HIBBARD, B. M. – WALKER, S. M. The role of mycoplasmas in reproduction. *Fertility and Sterility*, 1983, vol. 39, no. 6, s. 814-818.

USUI, R. – OHKUCHI, A. – MATSUBARA, S. – IZUMI, A. – WATANABE, T. – SUZUKI, M. – MINAKAMI, H. Vaginal lactobacilli and preterm birth. *Journal of Perinatal Medicine*, 2002, vol. 30, s. 458-466.

VANCINI, R. G. – BENCHIMOL, M. Entry and intracellular location of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis*. *Archives of Microbiology*, 2008, vol. 189, s. 7–18.

VESELSKÁ, A. [online]. Dostupné z: <http://www.veselska.cz/mykoplasmata.htm#1>. [citováno 2009-01-08].

VOTAVA, M. – ONDROVČÍK, P. *Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova Univerzita v Brně, Fakulta Lékařská, 1998. 90 s. ISBN 80-210-1805-4.

VOTAVA, M. et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.

WAITES, K. B. – RUDD, P. T. – CROUSE, D. T. – CANUPP, K. C. – NELSON, K. G. – RAMSEY, C. – CASSEL, G. H. Chronic *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis* infections of central nervous system in preterm infants. *The Lancet*, January 2/9 1988, s. 17-21.

WAITES, K. B. – KATZ, B. – SCHELONKA, R. L. Mycoplasmas and Ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clinical microbiology reviews*, October 2005, vol. 18, no. 4, s. 757-789.

WOESE, C. R. – STACKEBRANDT, E. – LUDWIG, W. What are mycoplasmas: the relationship of tempo and mode in bacterial evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 1985, vol. 21, s. 305-316.

ZAHRADNICKÝ, J. et al. *Mikrobiologie a epidemiologie*. Praha: Avicenum, 1987. 623 s.

ZAMBOR, M. – JAVOROVÁ, J. – VIKOVÁ, E. Diagnostika, klinika a liečba uretritíd vyvolaných mykoplazmami. *Československá dermatologie*, 1990, roč. 65, č. 3, s. 200-205.

ZINZENDORF, N. Y. – KOUASSI-AGBESSI, B. T. – LATHRO, J. S. – DON, C. – KOUADIO, L. – LOUKOU, Y. G. *Ureaplasma urealyticum* or *Mycoplasma hominis* infections and semen quality of infertile men in Abidjan. *Journal of Reproduction and Contraception*, 2008, vol. 19, no. 2, s. 65-72.

[online]. Dostupné z:

http://vasatwiki.icrisat.org/index.php/Taxonomy_and_phylogeny_of_mycoplasma.

[citováno 2009-01-11].

[online]. Dostupné z: http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?doc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_15. [citováno 2009-01-08].

[online]. Dostupné z: <http://www.elitechgroup.com/en/microbiology/mycofast-evolution3/>. [citováno 2009-01-08].

[online]. Dostupné z: http://www.bio-rad.com/B2B/BioRad/product/br_category.jsp. [citováno 2009-01-08].

[online]. Dostupné z: <http://www.liofilchem.net/en/pdf/mycoplasmasystemplus.pdf>. [citováno 2009-01-08].