

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

***Mycoplasma hominis* v genitálním ústrojí žen**

Autoreferát disertační práce

Mgr. Markéta Vydržalová

Pardubice 2007

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia v doktorském studijním programu lékařská mikrobiologie na Ústavu klinické mikrobiologie, Lékařské fakulty v Hradci Králové a na Katedře biologických a biochemických věd, Univerzity Pardubice.

Uchazeč: Mgr. Markéta Vydržalová
Katedra biologických a biochemických věd
Univerzita Pardubice

Školitel: doc. MUDr. Olga Rysková, CSc.
Ústav klinické mikrobiologie
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Oponenti: MUDr. Karel Mencl, CSc.
Pardubická krajská nemocnice, a. s.
Kyjevská 44, 532 03 Pardubice

doc. MVDr. Dagmar Zendulková, CSc.
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinárního lékařství
Palackého 1-3, 612 42 Brno

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové.

Souhrn

Disertační práce byla zaměřena na studium diagnostických metod k průkazu *Mycoplasma hominis* a sledování výskytu uvedeného druhu v pohlavním ústrojí a vzorcích amniové tekutiny žen. Výsledky byly hodnoceny ve vztahu k zdravotnímu stavu pacientek, jejich věku a používané antikoncepci.

Celkem bylo vyšetřeno 771 stěrů odebraných z krčku děložního stejného počtu náhodně vybraných žen. *Mycoplasma hominis* bylo vykultivováno ze 133 (17,3 %) vzorků. Za účelem ověření správnosti výsledků kulturační metody byla zavedena metoda průkazu DNA polymerasovou řetězovou reakcí.

Touto metodou byla DNA *Mycoplasma hominis* zjištěna v 31 (16,8 %) ze 185 transportních médií, v nichž byly tampónové stěry dopraveny do laboratoře. Z uvedeného počtu transportních médií bylo *Mycoplasma hominis* vykultivováno z 27 (14,6 %). Kulturační technikou byl však mikroorganismus prokázán také ve dvou vzorcích, které metoda PCR neodhalila.

Nález *Mycoplasma hominis* ve stěrech z krčku děložního žen byl hodnocen ve vztahu k zdravotnímu stavu, používané antikoncepci a věku pacientky. Nejčastěji byl sledovaný mikroorganismus prokázán v 8 (28,6 %) vzorcích žen s amenoreou. Ze stěrů od žen s hormonální antikoncepcí bylo 40 (15,9 %) vzorků s pozitivním nálezem, což se téměř shodovalo s výsledky žen bez antikoncepce 64 (16,2 %). Nejvyšší výskyt byl zjištěn u žen se zavedeným nitroděložním tělískem 27 (18,5 %). Ve vztahu k věku bylo *Mycoplasma hominis* nejčastěji diagnostikováno u 51 (19,8 %) žen ve věkové kategorii 31 – 40 let.

Dále bylo vyšetřeno 202 vzorků amniové tekutiny stejného počtu těhotných žen. *Mycoplasma hominis* bylo izolováno z 21 (10,4 %) vzorků kulturační metodou a z 51 (25,2 %) vzorků metodou RT-PCR. Získané výsledky byly vyhodnoceny ve vztahu k dělici těhotenství a porodní váze novorozence.

Ženy kulturačně pozitivní porodily po 37. týdnu těhotenství zdravé novorozence s váhou vyšší než 2 500 g. Pouze jedna žena (10 %) porodila v 37. týdnu těhotenství a jedna žena (14,3 %) porodila dítě s váhou 2 460 g.

Při hodnocení výsledků získaných metodou RT-PCR bylo zjištěno, že z 51 žen s pozitivním nálezem *Mycoplasma hominis* v amniové tekutině, dvě ženy (28,6 %) porodily děti v řádném termínu s porodní váhou nižší než 2 500 g. Jedna žena (10 %) porodila před 37. týdnem těhotenství.

Citlivost na antibiotika byla testována u 121 kmenů *Mycoplasma hominis* diluční zkumavkovou metodou. Z uvedeného počtu 2 (1,7 %) kmeny vykazovaly rezistenci na doxycyklin ($MIC \geq 8$) a 2 (1,7 %) kmeny na ofloxacin ($MIC \geq 8$). Všechny kmeny *Mycoplasma*

Všechny kmeny *Mycoplasma hominis* byly rezistentní k erytromycinu (MIC_{90} 1 000mg/l). MIC_{90} byla u ciprofloxacinu 2 mg/l, linkomycinu 2 mg/l, doxycyklinu 0,5 mg/l a ofloxacinu 2 mg/l. Zjištěné hodnoty MIC_{90} dokumentují dobrou citlivost *Mycoplasma hominis* k uvedeným antibakteriálním léčivům.

Summary

Doctoral thesis was focused on diagnostic method of detection of *Mycoplasma hominis* and occurrence of this microorganism in female genital tract in relation to health status, kind of contraception and age of patient.

A total of 771 swabs taken from cervix of the same number of randomly selected women were included in the study. *Mycoplasma hominis* was cultivated from 133 (17.3 %) specimens. In order to verify the cultivation method, the polymerase chain reaction was applied to detect *Mycoplasma hominis* DNA.

The DNA of *Mycoplasma hominis* was detected in 31 (16.8 %) of 185 transport media by using PCR. This microorganism was cultivated from 27 (14.6 %) of transport media. On the other hand, cultivation was positive in two samples which the PCR didn't reveal.

Results of the occurrence of *Mycoplasma hominis* were evaluated according to health status, sort of contraception and age of patient. The highest rate of this microorganism was determined in the group of women with amenorrhoea, in which 8 (28.6 %) women were positive for *Mycoplasma hominis*. The group of women using the hormonal contraception was *Mycoplasma hominis* positive in 40 cases (15.9 %). Almost same results were found in 64 (16.2 %) of women without contraception. The highest prevalence was observed in 27 (18.5 %) of women with intrauterine device. According to age, *Mycoplasma hominis* was determined in samples of 51 (19.8 %) women aged 31 – 40 years.

Furthermore, 202 amniotic fluid samples of the same number of women were examined. *Mycoplasma hominis* was isolated from 21 (10.4 %) samples by cultivation method and from 51 (25.2 %) samples by RT-PCR. The results were evaluated in relation to week of gestation and birth-weight of newborns.

Women positive for *Mycoplasma hominis* by cultivation method gave birth after 37th week of gestation. Newborns were healthy and their birth-weights were higher than 2 500g. Only one woman (10 %) gave a birth after 37th gestational week and one woman's newborn had birth-weight of 2 460g.

The results of RT-PCR analysis of amniotic fluid show that 51 women were positive for *Mycoplasma hominis*. Two (28.6 %) of the women delivered in time, but the birth-weight of newborns was lower than 2 500g. Only one woman (10 %) had preterm delivery before 37th gestational week.

The antibiotic susceptibilities of 121 *Mycoplasma hominis* strains for different kinds of antibiotics were tested. The minimal inhibition concentrations were determined by the tube dilution method. Two (1.7 %) strains were resistant to doxycycline (MIC₅₀≥8) and two (1.7 %) were resistant to erythromycin (MIC₅₀≥8).

strains to ofloxacin ($MIC \geq 8$). All isolates were highly resistant to erythromycin ($MIC_{90} = 1\ 000\ \text{mg/l}$). MIC_{90} was found to be 2 mg/l for ciprofloxacin, 2 mg/l for lincomycin, 0.5 mg/l for doxycycline and 2 mg/l for ofloxacin. In general, all strains of *Mycoplasma hominis* showed very good susceptibility to all antibiotics tested.

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Cíl práce.....	8
3	Vyšetřovaný materiál.....	9
4	Výsledky.....	10
4.1	Růstové vlastnosti <i>Mycoplasma hominis</i>	10
4.2	Stěry z krčku děložního.....	11
4.2.1	Kultivační vyšetření.....	11
4.2.2	Polymerasová řetězová reakce.....	13
4.3	Amniová tekutina.....	14
4.3.1	Kultivační vyšetření.....	14
4.3.2	RT-PCR.....	15
4.4	Citlivost na antibiotika.....	17
5	Diskuse.....	19
6	Závěr.....	26
	Seznam literatury.....	29
	Seznam zkratek.....	33

1 Úvod

Mikrobiální flóra genitálního ústrojí ženy je velmi rozmanitá a individuální. Její složení je ovlivněno mnoha faktory, z nichž mezi nejvýznamnější patří hormonální poměry, věk, zdravotní stav, hygienické návyky a v neposlední řadě také sexuální aktivita a zejména střídání sexuálních partnerů. Poševní mikroflóra je tvořena směsí různých druhů mikroorganismů, proto nelze vždy spolehlivě odlišit, kdy je daný mikrob patogenem a kdy komenzálem.

Poševní prostředí a s tím související kvantitativní a kvalitativní rovnováha mezi jednotlivými druhy mikroorganismů je udržována především laktobacily, které svými metabolickými pochody vytvářejí v pochvě kyselé pH a potlačují tak množení nežádoucích druhů. Snížení počtu laktobacilů, případně jejich vymizení z poševní sliznice, může vést k pomnožení tzv. rizikových mikroorganismů mezi které jsou řazeny stafylokoky, enterokoky, *Gardnerella (G.) vaginalis*, *Escherichia (E.) coli*, kvasinky, anaerobní nesporelující bakterie, *Mycoplasma (M.) hominis*, *Ureaplasma (U.) urealyticum* a další.

M. hominis je nejmenší známý mikroorganismus jehož povrch je tvořen pouze třívrstevnou membránou. Absence bakteriální stěny poskytuje *M. hominis* přirozenou rezistenci na antibakteriální léčiva zaměřená svým účinkem na tuto strukturu buňky. *M. hominis* se dále vyznačuje plasticitou a rozmanitou morfologií bakteriálních buněk a charakteristickým vzhledem kolonií na povrchu agarových médií, který je přirovnáván k sázenému vejci.

M. hominis je dáváno do souvislosti s různými projevy infekčního onemocnění genitálního ústrojí žen. Bývá izolováno z vyšetřovaného materiálu při bakteriální vaginóze, zánětlivém onemocnění urogenitálního traktu, horečkách po porodu či potratu a také z novorozenců infikovaných matek. Míra patogenity tohoto druhu je však dosud studována. Důvodem je výskyt *M. hominis* nejčastěji ve směsi s jinými druhy mikroorganismů, které se rovněž mohou podílet na vzniku infekčního onemocnění genitálního ústrojí žen.

Cílem práce bylo zjištění výskytu *M. hominis* v genitálním ústrojí žen zdravých a žen s různými gynekologickými obtížemi. Dále ověření diagnostických postupů k průkazu tohoto mikroorganismu v klinickém materiálu, včetně stanovení citlivosti izolovaných kmenů na vybraná antibakteriální léčiva.

2 Cíl práce

Hlavním cílem bylo zjistit výskyt *M. hominis* v genitálním ústrojí žen a dosažené výsledky vyhodnotit především ve vztahu k zdravotnímu stavu pacientek a dalším ukazatelům. Tomuto cíli předcházelo zavedení a ověření diagnostických metod, včetně odběru a transportu klinického materiálu do laboratoře. Nedílnou součástí bylo stanovení citlivosti izolovaných kmenů na vybraná antibakteriální léčiva.

Výzkumná činnost zahrnovala následující etapy:

- Ověření kultivačních podmínek pro průkaz *M. hominis* a sestavení postupu vyšetření vzorků.
- Zavedení metody PCR - výběr vhodných primerů a optimalizace PCR reakce.
- Vyšetření stěrů odebraných z krčku děložního náhodně vybraných žen na přítomnost *M. hominis* metodou kultivační a PCR.
- Vyhodnocení výsledků diagnostiky *M. hominis* metodou kultivační a PCR ve vztahu k zdravotnímu stavu, druhu používané antikoncepce a věku ženy.
- Vyšetření vzorků amniové tekutiny kultivační metodou.
- Zavedení metody RT-PCR - výběr vhodných primerů a sondy. Optimalizace průběhu reakce.
- Vyšetření vzorků amniové tekutiny metodou RT-PCR s cílem ověření výsledků získaných kultivační metodou.
- Kvantitativní stanovení citlivosti kmenů *M. hominis* na vybraná antibakteriální léčiva diluční metodou.
- Vyhodnocení výsledků získaných při vyšetření amniových tekutin ve vztahu k délce těhotenství a porodní váze novorozence.

3 Vyšetřovaný materiál

Vyšetřovaným materiálem byly stěry z krčku děložního náhodně vybraných žen, bez ohledu na věk a klinický nález. Stěry odebírali lékaři v ambulanci gynekologicko-porodnického oddělení Krajské nemocnice Pardubice, soukromé gynekologické ordinaci G-MED v Pardubicích a MUDr. Marek Dobrkovský a MUDr. Pavel Slanina v soukromých gynekologických ordinacích v Pardubicích.

Vzorky byly bezprostředně po odběru umístěny do transportního média a dopraveny do laboratoře, kde byly nejpozději do 4 hodin od odběru zpracovány.

Spolu s vyšetřovaným materiálem byly dopraveny průvodní listy, které obsahovaly informace o věku pacientky, gynekologické anamnéze a klinickém nálezu.

Dále byly vyšetřovány vzorky amniové tekutiny odebrané ženám v období mezi 15. – 22. týdnem těhotenství na gynekologicko-porodnickém oddělení Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Odběr amniové tekutiny byl ženám doporučen vzhledem k jejich věku nebo výsledku biochemického screeningu.

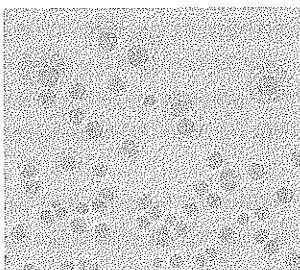
Vzorky byly dopraveny do laboratoře ve zkumavkách umístěných v termoboxu při 8 °C. Ihned po transportu byly vzorky kultivovány a následně uloženy do mrazicího boxu, kde byly při -80 °C uchovávány k následnému vyšetření molekulárně biologickými metodami.

4 Výsledky

4.1 Růstové vlastnosti *Mycoplasma hominis*

Růst *Mycoplasma hominis* na agarových půdách

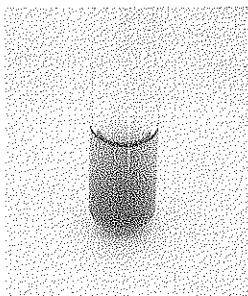
Růst *M. hominis* na pevných půdách, po 2 – 3 denní inkubaci při 37 °C v prostředí s 5 % CO₂, byl hodnocen mikroskopicky při zvětšení 120x. *M. hominis* vytvářelo na agarových půdách charakteristické kolonie vzhledu „sázeného vejce“ s tmavým středem vnořeným do agaru a světlejší okrajovou zónou nacházející se na povrchu (obr. 1)



Obr. 1 Charakteristický tvar kolonií *Mycoplasma hominis* na PLO agaru (150x)

Růst *Mycoplasma hominis* v tekutých půdách

V tekutém médiu byl růst *M. hominis* hodnocen vizuálně po 2 - 3 denní inkubaci při 37 °C. Utilizace argininu se projevila zvýšením pH média a následnou změnou zabarvení přítomného acidobazického indikátoru. Indikátorem byla fenolová červec, která změnila původně oranžové zabarvení média na tmavě růžové (obr. 2).



Obr. 2 Růst *Mycoplasma hominis* v PLO bujónu s argininem a fenolovou červecí

4.2 Stěry z krčku děložního

4.2.1 Kultivační vyšetření

Celkem bylo vyšetřeno 771 tampónových stěrů odebraných z krčku děložního stejného počtu náhodně vybraných žen. Z uvedeného počtu bylo 133 (17,3 %) vzorků s pozitivním nálezem *M. hominis*. Výskyt *M. hominis* byl dále posuzován ve vztahu k anamnéze a klinickému nálezů v době odběru, k věku pacientek a druhu používané antikoncepce.

V tabulce I jsou uvedeny výsledky výskytu *M. hominis* ve vztahu k anamnéze a klinickému obrazu žen v době odběru. Ženy byly zařazeny do 13 skupin podle zdravotního stavu v době odběru. Z údajů je zřejmé, že nejčastěji byl mikroorganismus prokazován ve vzorcích žen s amenoreou (28,6 %) a těhotných žen, u kterých byl vykultivován z 24,5 % vyšetřených vzorků. U žen zdravých a žen s různým stupněm prekancerózy bylo 18,7 a 19,7 % vzorků s pozitivním nálezem *M. hominis*.

Tab. I Výskyt *Mycoplasma hominis* ve stěrech z krčku děložního žen ve vztahu k anamnéze a klinickému obrazu

Skupina	Anamnéza Klinický obraz	Počet vyšetřených vzorků	Pozitivní vzorky	
			n	%
1	Bez nálezu, zdravé	134	25	18,7
2	Zánětlivé změny	134	14	10,4
3	Prekancerózy	137	27	19,7
4	Gravidita	98	24	24,5
5	Sterilita	40	7	17,5
6	Susp. kolpo/cervix	102	18	17,6
7	Amenorea	28	8	28,6
8	Metroragie	20	3	15,0
9	Susp. endometrium	12	0	0
10	Missed AB	5	1	20,0
11	Polyp	20	1	5,0
12	Myom	4	1	25,0
13	Ostatní	37	4	10,8
Celkem		771	133	

Legenda:

1. skupina - zdravé ženy bez klinického nálezu
2. skupina – ženy se zánětlivými změnami
3. skupina – ženy s H-SIL, L-SIL, CIN I, CIN II, CIN III, ASCUS, LEEP
4. skupina – ženy gravidní

5. skupina – ženy sterilní
6. skupina – ženy, u kterých byl diagnostikován suspektní cervix nebo suspektní kolpo
7. skupina – ženy, u kterých byla diagnostikována amenorea
8. skupina – ženy, u kterých byla diagnostikována metroragie
9. skupina – ženy, u kterých bylo diagnostikováno suspektní endometrium
10. skupina – ženy, u kterých bylo diagnostikováno missed AB (zamklé těhotenství)
11. skupina – ženy, u kterých byl diagnostikován polyp
12. skupina – ženy, u kterých byl diagnostikován myom
13. skupina – ženy, s neobjasněným krvácením, kontaktním krvácením, bolestí břicha, cystou, ženy v šestinedělí, ženy v klimakteriu

Pro statistické hodnocení souvislosti mezi výskytem *M. hominis* v genitálním ústrojí žen a klinickou symptomatologií byl použit χ^2 -testu dobré shody. Byla testována hypotéza vzájemné nezávislosti výskytu *M. hominis* na klinické symptomatologii vůči alternativě závislosti. Hypotéza nezávislosti nebyla zamítnuta. Hladina významnosti byla $p = 0,181$. Statistickým vyhodnocením nebyla nalezena souvislost mezi výskytem *M. hominis* a klinickou symptomatologií.

V tabulce 2 jsou vyhodnoceny nálezy *M. hominis* v souvislosti s používanou antikoncepcí. Z tohoto hodnocení byly vyřazeny ženy, u nichž byla prokázána neplodnost. Ze zbývajících 673 vyšetřených žen bylo *M. hominis* izolováno z 18,5 % vzorků od žen se zavedeným nitroděložním tělískem. Výskyt *M. hominis* v genitálním ústrojí žen užívajících hormonální antikoncepci a žen bez antikoncepce byl téměř shodný - 15,9 % a 16,2 % pozitivních nálezů.

Tab. 2 Výskyt *Mycoplasma hominis* ve stěrech z krčku děložního žen ve vztahu k antikoncepci

Druh antikoncepce	Počet vyšetřených vzorků	Pozitivní vzorky	
		n	%
Bez antikoncepce	395	64	16,2
Hormonální antikoncepce	251	40	15,9
Nitroděložní tělísko	27	5	18,5
Celkem	673	109	

Stejná statistická metoda byla použita ke zjištění vztahu výskytu *M. hominis* na používané antikoncepci. Testována byla hypotéza nezávislosti výskytu *M. hominis* na používané antikoncepci vůči hypotéze závislosti. V našem souboru nebyla prokázána souvislost mezi výskytem *M. hominis* a používanou antikoncepcí (hladina významnosti $p = 0,785$).

Pro další hodnocení byly pacientky rozděleny do 6 věkových kategorií. O výskytu *M. hominis* ve stěrech z krčku děložního žen v jednotlivých skupinách informuje tabulka 3.

Nejvíce pozitivních vzorků bylo od žen nad 61 let (20,0 %), dále žen ve věkové kategorii 31 – 40 let (19,8 %) a žen do 20 let (19,4 %). Výsledky však mohou být ovlivněny malým počtem vyšetřených vzorků v souborech pacientek některých věkových skupin.

Tab. 3 Výskyt *Mycoplasma hominis* ve stěrech z krčku děložního žen ve vztahu k věku

Věk	Počet vyšetřených vzorků	Pozitivní vzorky	
		n	%
20	31	6	19,4
21-30	259	43	16,6
31-40	257	51	19,8
41-50	122	21	17,2
51-60	77	7	9,1
61	25	5	20,0
Celkem	771	133	

Pro testování rozdílů věku mezi skupinami dle výskytu *M. hominis* byl použit neparametrický Mann-Whitney test. Hladina významnosti testu byla $p = 0,474$. Statisticky významný rozdíl ve věku vyšetřovaných žen dle výskytu *M. hominis* nebyl nalezen.

4.2.2 Polymerasová řetězová reakce

Výsledky detekce *Mycoplasma hominis* v transportním médiu

Celkem bylo metodou PCR a kulturační metodou vyšetřeno 185 vzorků transportních médií, ve kterých byly uchovávány stěry odebrané z krčku děložního žen. V 31 (16,8 %) médiích byla metodou PCR prokázána DNA *M. hominis*. Kulturační metodou byl sledovaný druh prokázán pouze ve 27 (14,6 %) vzorcích z 31 PCR pozitivních vzorků. Metodou PCR se tedy podařilo určit 4 pozitivní vzorky, které kulturačně prokázány nebyly.

Ze 185 transportních médií bylo vykultivováno 29 kmenů (15,7 %) *M. hominis*, z nichž bylo metodou PCR prokázáno pouze 27 (14,6 %) vzorků pozitivních na přítomnost DNA *M. hominis*.

K detekci DNA *M. hominis* byly použity primery RNAH1 a RNAH2, jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab. 4 Nukleotidové sekvence primerů použitých při PCR (Blanchard a kol., 1993)

Označení primerů	Nukleotidová sekvence (5'-3')	Délka ampliconu
RNAH1	CAATGGCTAATGCCGGATACGC	334 bp
RNAH2	GGTACCGTCAGTCTGCAAT	

Obrázek 3 znázorňuje elektroforetický průkaz DNA *M. hominis* ve vzorcích po předchozí PCR reakci. Vzorky umístěny v jamkách 1 - 4 byly vyhodnoceny jako pozitivní. Negativní výsledek poskytli pouze vzorek v jamce 5.



Obr. 3 Výsledek stanovení DNA *Mycoplasma hominis* ve vyšetřovaných vzorcích

Legenda: M – marker molekulových hmotností pUC 19

1 – 7 – jamky s různými vzorky

PK – pozitivní kontrola

NK – negativní kontrola

4.3 Amniová tekutina

Celkem bylo vyšetřeno 202 vzorků amniové tekutiny kultivační technikou a metodou RT-PCR. *M. hominis* bylo vykultivováno z 21 (10,4 %) vzorků. Metodou RT-PCR byla DNA *M. hominis* prokázána v 51 (25,2 %) vzorcích. Výsledky získané oběma metodami byly vyhodnoceny ve vztahu k délce těhotenství a porodní váze novorozence.

4.3.1 Kultivační vyšetření

V tabulce 5 je uvedena souvislost mezi výskytem *M. hominis* v amniové tekutině a předčasným porodem. *M. hominis* bylo prokázáno ve 20 (10,4 %) vzorcích žen, které porodily po 37. týdnu těhotenství, pouze v jednom případě bylo vykultivováno od ženy, která rodila před 37. týdnem těhotenství.

Tab. 5 Výskyt *Mycoplasma hominis* v amniové tekutině žen zjištěný kultivační metodou ve vztahu k délce těhotenství (vyšetřeno 202 vzorků)

Délka těhotenství	Počet vyšetřených vzorků	Z toho			
		pozitivní	%	negativní	%
> 37. týden	192	20	10,4	172	89,6
≤ 37. týden	10	1	10,0	9	90,0

Statistická souvislost mezi výskytem *M. hominis* prokázaným kultivační metodou v amniové tekutině a předčasným porodem byla testována Fischerovým přesným testem. Statisticky významná souvislost mezi kultivační pozitivitou a délkou těhotenství nebyla nalezena. Hladina významnosti testu $p = 1,000$.

V následující tabulce 6 jsou zaznamenány výsledky vyšetření amniových tekutin získané kultivační metodou ve vztahu k porodní váze novorozence. Z údajů vyplývá, že kultivační metodou bylo *M. hominis* vykultivováno z 20 (10,3 %) vzorků amniové tekutiny žen, jejichž novorozenec měl porodní váhu větší nebo rovnu 2 500 g. Pouze jeden novorozenec měl porodní váhu 2 460 g.

Tab. 6 Výskyt *Mycoplasma hominis* v amniové tekutině žen zjištěný kultivační metodou ve vztahu k porodní váze novorozence (vyšetřeno 202 vzorků)

Hmotnost novorozence	Počet vyšetřených vzorků	Z toho			
		pozitivní	%	negativní	%
≥ 2 500 g	195	20	10,3	175	89,7
< 2 500 g	7	1	14,3	6	85,7

Souvislost mezi kultivačním průkazem *M. hominis* v amniové tekutině a hmotností novorozence byla testována Fischerovým přesným testem. Statisticky významná souvislost mezi kultivační pozitivitou a hmotností novorozence nebyla nalezena. Hladina významnosti testu $p = 0,545$.

4.3.2 RT-PCR

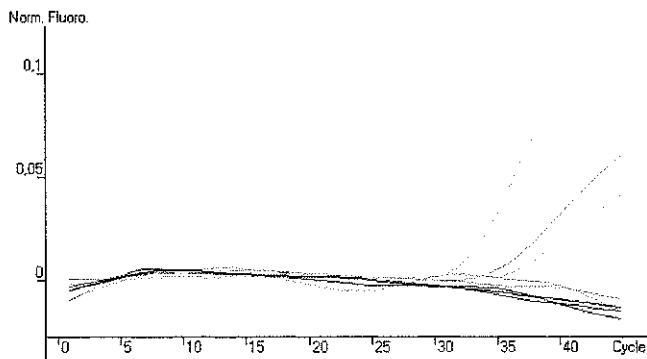
Sekvence primerů a sondy byly převzaty z práce Baczyńska a kol. (2004). Z původního navrženého počtu dvou sond byla zvolena pouze jedna, která byla fluorescenčně označena (tab. 7).

Tab. 7 Nukleotidové sekvence primerů použitých při RT-PCR (Baczynska a kol., 2004)

Označení primerů a sondy	Nukleotidová sekvence (5' - 3')	Délka ampliconu
mhongaprv mhongapfv	TTT ATC TTC TGG CGT AAT GAT ATC TTC G GGA AGA TAT GTA ACA AAA GAA GGT GCT G	144bp
BHQ1 – FAM	AGC AGG ZGC TAA AAA GGT GTT TAT TAC TGC TCC	

Výsledky vyšetření vzorků amniové tekutiny metodou RT-PCR

Metodou RT-PCR bylo vyšetřeno 202 vzorků amniové tekutiny. Z tohoto počtu byla DNA *M. hominis* prokázána v 51 (25,2 %) vzorcích. O výsledcích vyšetření sedmi vzorků amniové tekutiny informuje graf 1.



Graf 1 Výsledek detekce DNA *Mycoplasma hominis* ve vzorcích amniové tekutiny metodou RT-PCR

Legenda:

Vzorek								
Kopii/ml	-	2 000	191 000	8 000	-	-	28 000	- NK

Hodnocení výsledků vyšetření ve vztahu k délce těhotenství byly zaznamenány v tabulce 8. DNA *M. hominis* byla prokázána v 50 (26,0 %) vzorcích od žen, které porodily po 37. týdnu těhotenství, neboli v řádném termínu. Pouze v jednom případě byla detekována DNA *M. hominis* u ženy, která porodila v 37. týdnu těhotenství.

Tab. 8 Výskyt *Mycoplasma hominis* v amniové tekutině žen zjištěný metodou RT-PCR ve vztahu k délce těhotenství (vyšetřeno 202 vzorků amniové tekutiny)

Délka těhotenství	Počet vyšetřených vzorků	Z toho			
		pozitivní	%	negativní	%
> 37. týden	192	50	26,0	142	74,0
≤ 37. týden	10	1	10,0	9	90,0

Statistická souvislost mezi výskytem *M. hominis* zjištěným metodou RT-PCR v amniové tekutině a předčasným porodem byla prokazována Fischerovým přesným testem. Souvislost nebyla nalezena. Hladina významnosti testu $p = 0,570$.

V tabulce 9 jsou zaznamenány výsledky průkazu DNA *M. hominis* metodou RT-PCR ve vzorcích amniové tekutiny ve vztahu k porodní váze novorozence. Z údajů vyplývá, že touto metodou byla DNA *M. hominis* prokázána ve 49 (25,1 %) vzorcích amniové tekutiny. Porodní váha novorozenců byla 2 500 g případně vyšší. Pouze ve dvou případech byla DNA *M. hominis* v amniové tekutině žen, jejichž novorozenci měli porodní váhu nižší 2 460 g a 1 930 g.

Tab. 9 Výskyt *Mycoplasma hominis* v amniové tekutině žen zjištěný metodou RT-PCR ve vztahu k porodní váze novorozence (vyšetřeno 202 vzorků amniové tekutiny)

Hmotnost novorozence	Počet vyšetřených vzorků	Z toho			
		pozitivní	%	negativní	%
≥ 2 500 g	195	49	25,1	146	74,9
< 2 500 g	7	2	28,6	5	71,4

Souvislost mezi výskytem *M. hominis* zjištěným metodou RT-PCR v amniové tekutině a váhou novorozence byla prokazována Fischerovým přesným testem. Souvislost nebyla nalezena. Hladina významnosti testu $p = 1,000$.

Z uvedených dat vyplývá, že kultivační nález *M. hominis* ve vzorcích amniové tekutiny byl potvrzen také metodou RT-PCR. V kultivačně pozitivních vzorcích byl téměř vždy naměřen vyšší počet kopií než u vzorků určených pouze metodou RT-PCR.

4.4 Citlivost na antibiotika

Celkem bylo testováno 121 kmenů *M. hominis* vykultivovaných z krčku děložního žen s různými klinickými nálezy. Zkurnavkovou díluční metodou byly zjištěny MIC doxycyklinu, ciprofloxacinu, ofloxacinu, linkomycinu a erytromycinu.

O stanovených účinných koncentracích informuje tabulka 10. Z uvedených údajů vyplývá, že 90 % kmenů *M. hominis* bylo inhibováno doxycyklinem v koncentraci 0,5 mg/l. Ciprofloxacín, ofloxacin a linkomycin potlačovaly růst 90 % kmenů v koncentraci 2 mg/l. MIC erytromycinu inhibující růst 90 % testovaných kmenů dosahovala hodnoty 1 000 mg/l.

Tab. 10 Minimální inhibiční koncentrace *Mycoplasma hominis* stanovená zkumavkovou diluční metodou (vyšetřeno 121 kmenů)

Antibiotikum	MIC (mg/l)		
	Rozmezí koncentrací	50 %	90 %
Doxycyklin	0,06 - 8	0,25	0,5
Ciprofloxacín	0,06 - 8	1	2
Ofloxacin	0,06 - 8	1	2
Linkomycin	0,06 - 8	1	2
Erytromycin	62,5 - 2 000	500	1 000

Legenda: MIC – minimální inhibiční koncentrace

Tabulka 11 informuje o počtu citlivých kmenů k jednotlivým koncentracím testovaných antibakteriálních léčiv. Ze 121 kmenů byly 3 kmeny rezistentní a to jeden k doxycyklinu (MIC \geq 8), druhý k ofloxacinu (MIC \geq 8) a na třetí kmen byla neúčinná obě uvedené antibiotika (MIC \geq 8).

Tab. 11 Počty kmenů *Mycoplasma hominis* citlivých na jednotlivé koncentrace antibiotik

Antibiotikum	Počet citlivých kmenů na jednotlivé koncentrace antibiotik (mg/l)							
	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	\geq 8
Doxycyklin	15 (12)	36 (42)	46 (80)	16 (93)	5 (98)	1 (98)	0 (98)	2 (100)
Ciprofloxacín		2 (2)	0 (2)	16 (15)	76 (78)	27 (100)		
Ofloxacin			6 (5)	35 (34)	64 (87)	14 (98)	0 (98)	2 (100)
Linkomycin		3 (2)	13 (13)	30 (38)	44 (74)	31 (100)		
Erytromycin								121 (100)

Legenda: x - počet citlivých kmenů

(y) - % citlivých kmenů

5 Diskuse

Zánětlivá onemocnění pohlavních orgánů žen jsou považována za sexuálně přenosná onemocnění, která se vyskytují častěji než klasické pohlavní nákazy jako kapavka, syfilis, lymfogranulóma venereum, ulcus molle aj. Přesto, že následky neléčeného zánětu ve většině případů nejsou tak závažné jako u klasických pohlavních chorob, přinášejí tyto infekce řadu problémů a to nejen fyzických, ale i psychických. Nepříjemné jsou zvláště často se opakující záněty, případně jejich chronický průběh.

Ve většině případů jsou zánětlivé změny vyvolány bakteriemi nebo kvasinkami. Vzácněji se na tomto onemocnění podílejí viry. Často se jedná o polymikrobiální infekci zahrnující stafylokoky, enterokoky, streptokoky, enterobakterie, mykoplazmata, chlamydie, anaerobní mikroorganismy aj.

Z mykoplazmat podílejících se na zánětlivém onemocnění genitálního ústrojí se nejčastěji vyskytují druhy *M. hominis* a *U. urealyticum*. *M. hominis* se často vyskytuje v genitálním ústrojí žen trpících bakteriální vaginózou a bakteriální kolpítidou. Za určitých okolností může pronikat do vnitřních pohlavních orgánů a spolu s ostatními patogenními mikroorganismy se podílet na vzniku hlubokého pánevního zánětu. Zánětlivé změny způsobené *M. hominis* v děloze a placentě mohou vyvolat předčasný porod. Průnik *M. hominis* do amniové tekutiny může ovlivnit porodní váhu novorozence, případně způsobit poporodní horečku novorozence i matky.

Cílem studie bylo zjistit výskyt *M. hominis* v genitálním ústrojí u náhodně vybraného souboru žen a výsledky vyhodnotit ve vztahu ke zdravotnímu stavu pacientky, jejímu věku a druhu používané antikoncepce. Dalším úkolem bylo zavedení metod PCR a RT-PCR pro průkaz a kvantitativní stanovení DNA *M. hominis* v klinických vzorcích. Vzhledem k informacím o narůstající rezistenci kmenů *M. hominis* k antibakteriálním léčivům byla u izolovaných kmenů zjišťována citlivost na vybrané druhy antibiotik.

Celkem bylo kulturační metodou vyšetřeno 771 stěrů z krčku děložního stejného počtu náhodně vybraných žen, které navštívily gynekologickou ordinaci. *M. hominis* bylo prokázáno ve 133 vzorcích (17,3 %). Zjištěná frekvence výskytu *M. hominis* se shoduje s výsledky publikovanými jinými autory. Schlicht a kol. (2004) uvádějí 15,6% výskyt *M. hominis*. Vyšší výskyt pozitivních nálezů zaznamenali Arya a kol. (2001) - 21,7 %, Beikun a kol. (2001) - 24 % a Buček a kol. (1989) - 29,6 % pozitivních vzorků.

Vyhodnocením výskytu *M. hominis* ve vztahu ke klinické symptomatologii bylo zjištěno, že se tento mikroorganismus nejčastěji vyskytoval u žen, které navštívily gynekologa z důvodu vynechání menstruačního krvácení. V této skupině 28 žen bylo *M. hominis* prokázáno u 28,6 %

vyšetřovaných pacientek. Výsledek nelze srovnávat, neboť údaje o výskytu *M. hominis* u žen s tímto problémem nebyly v dostupné literatuře nalezeny.

Druhou skupinou s vyšším výskytem *M. hominis* byly těhotné ženy (98), u nichž byl tento mikroorganismus prokázán u 24,5 % vyšetřených vzorků. Naše poznatky se shodují s údaji Lamonta a kol. (1987), kteří prokázali *M. hominis* ve 25 % stěrů z krčku děložního zdravých těhotných žen. Nižší výskyt zaznamenali Chua a kol. (1998) a Cedillo-Ramirez a kol. (2000), kteří zjistili *M. hominis* v 17,7 % a ve 12 % vzorků. Nejvyšší počty pozitivních vzorků uvádějí Embil a kol. (1985). Autoři našli mikroorganismus v genitálním ústrojí u 36,7 % těhotných žen. Zvýšený výskyt *M. hominis* u těchto žen by mohl souviset se změnami hladin pohlavních hormonů. V průběhu těhotenství dochází také ke změně poševního prostředí, což může ovlivnit zastoupení jednotlivých druhů mikroorganismů vyskytujících se v pochvě ženy.

U žen s různými stupni prekancerózních změn bylo *M. hominis* prokázáno v 19,7 % případů. Prekancerózní změny nejčastěji způsobují některé z rizikových typů papilomavirů přenosné při pohlavním styku. Pro vznik prekanceróz je mimo jiné významný i počet sexuálních partnerů a časné zahájení sexuálního života. Tyto faktory podporují také přenos *M. hominis*. Výsledek u této skupiny žen nelze porovnat s jinými autory, protože se touto problematikou dosud nikdo nezabýval.

Téměř shodný procentuální výsledek byl zjištěn i u žen bez obtíží, z nichž bylo 18,7 % vzorků pozitivních. Tento výsledek je v rozporu s údaji publikovanými Cedillo-Ramirezem a kol. (2000), kteří zjistili pouze 2% výskyt *M. hominis* u zdravých žen. Arya a kol. (2001) prokázali *M. hominis* ve 12 % vzorků od zdravých žen a Hirai a kol. (1991) v 11,4 % vyšetřovaných vzorků. Vyšší výskyt *M. hominis*, uvedený v naší studii, by mohl být způsoben nepřesným udáním diagnóz od lékařů odebírajících cervikální výtěry. Příčinu je nutné hledat v klinických projevech, které vyvolává přítomnost *M. hominis* v genitálním ústrojí ženy. Často dochází pouze k neurčitým velmi mírným bolestem v podbřišku, mnohdy provázeným vodnatým výtokem z pochvy. Při poševním vyšetření nejsou viditelné zánětlivé změny. V případě, že žena při preventivním vyšetření u gynekologa neuvedla skutečné potíže, je možné, že byla zařazena do skupiny zdravých žen. Obdobné problémy mohly souviset také se skupinou žen se záněty, kde z celkového počtu 134 pacientek bylo pouze u 14 (10,4 %) prokázáno *M. hominis*.

Řada vědců se zabývala vztahem *M. hominis* ke vzniku BV. Literární údaje uvádějí výskyt tohoto mikroorganismu u žen s BV od 10-60 %. Je otázkou, zda tyto rozdílné výsledky neovlivňují právě nepřesně stanovené klinické diagnózy.

Významnou skupinou byly ženy s problémy s otěhotněním. Ve stěrech z krčku děložního těchto žen bylo *M. hominis* prokázáno v 17,5 % vyšetřovaných vzorků. Taylor-Robinson a McCormack (1980) uvádí, že na vzniku neplodnosti se může *M. hominis* podílet vyvoláním

zánětlivých změn na sliznici vejcovodů. Jiného názoru jsou Baczynska a kol. (2007), kteří zjišťovali změny ve vejcovodech, z nichž izolovali *M. hominis* a nálezy porovnali se změnami způsobenými jinými mikroorganismy, např. *N. gonorrhoeae*. Ze studie vyplynulo, že *M. hominis* nezpůsobovalo změny na sliznicích vejcovodů.

Guven a kol. (2007) vyšetřili 31 neplodných žen a shodný počet žen zdravých. Ve vzorcích z krčku děložního neplodných žen neprokázali přítomnost *M. hominis*. V kontrolní skupině zdravých žen izolovali tento mikroorganismus pouze ze vzorku jedné pacientky (3,2 %). Naproti tomu Fenkci a kol. (2002) vykultivovali *M. hominis* z 8 % stěrů z pohlavních orgánů neplodných žen. Vyšší výskyt *M. hominis* ve skupině neplodných žen uvádějí také Samra a kol. (1994).

V ostatních skupinách, do nichž byly zařazeny ženy s diagnózou metroragie, suspektní endometrium, Missed AB, myom, polyp a ostatní, tvořily malé skupiny s nízkým počtem pacientek a výsledky proto nelze považovat za spolehlivé.

Všechny zmíněné diagnózy byly vzájemně podrobeny statistické analýze. Jako nevhodnější se jevílo použití χ^2 – testu dobré shody. Byla testována hypotéza vzájemné nezávislosti výskytu *M. hominis* pro jednotlivé diagnózy vůči alternativě závislosti. Výsledek ukazuje, že mezi jednotlivými diagnózami nebyla nalezena souvislost s výskytem *M. hominis*.

Dalším faktorem, který by mohl ovlivnit výskyt *M. hominis* v genitálním ústrojí je antikoncepce. Arya a kol. (2001) prokázali *M. hominis* ve 24 % vzorků od žen se zavedeným nitroděložním tělískem a 36 % žen užívajících hormonální antikoncepci. Výsledky naší studie nedosahovaly uvedených hodnot. U žen, které používaly hormonální antikoncepci bylo *M. hominis* prokázáno u 15,9 % vyšetřených. Nitroděložní tělísko mělo zavedeno pouze 27 žen, z nichž u 5 (18,5 %) bylo zjištěno *M. hominis*. Ženy, které nepoužívaly antikoncepci, byly kolonizovány *M. hominis* v 16,2 % případů. Největší počet pozitivních nálezů byl u žen se zavedeným nitroděložním tělískem. Možnou komplikací, spojenou se zavedeným nitroděložním tělískem, je vzestupná infekce s následným zánětem pánevních orgánů.

Pro statistické vyhodnocení byl opět použit χ^2 – test dobré shody. Výsledkem testu bylo akceptování hypotézy nezávislosti. Hladina významnosti testu $p = 0,785$ potvrzuje, že nebyla prokázána souvislost výskytu *M. hominis* na druhu použité antikoncepce.

Sledování *M. hominis* v pohlavních orgánech žen různých věkových kategorií neodhalilo výrazné rozdíly. Nejčastěji se tento mikroorganismus vyskytoval u žen mezi 31. až 40. lety (19,8 %). Toto zjištění je v souladu s poznatky Hirai a kol. (1991). Shodné nálezy byly zaznamenány také ve skupině žen nad 60 let (20,0 %). V této skupině však bylo pouze 25 žen, což může ovlivnit spolehlivost výsledků. Je známo, že ženy po menopauze mají odlišné poměry

na poševní sliznici. Sliznice je suchá, snadno zranitelná a náchylná k infekci. Dochází ke snížení počtu laktobacilů a změně pH prostředí z kyselého na zásaditější, což umožňuje osídlení pochvy patogenními mikroorganismy.

Ke stanovení závislosti výskytu *M. hominis* na věku ženy byl použit χ^2 – test dobré shody. Testována byla hypotéza nezávislosti výskytu *M. hominis* pro jednotlivé věkové kategorie vůči závislosti. U tohoto testu byla na hladině významnosti $p = 0,395$ akceptována hypotéza nezávislosti. V testovaném souboru nebyla nalezena souvislost mezi výskytem *M. hominis* a věkem ženy.

Výběrem vhodné metody k rychlému a přesnému průkazu *M. hominis* v klinických vzorcích se zabývala řada laboratorních pracovníků. Nejstarší a „nejspolehlivější“ je stále metoda kultivační, umožňující prokázat *M. hominis* ve vyšetřovaném vzorku a dále testovat jeho vlastnosti včetně citlivosti na antibiotika. Její nevýhodou jsou vysoké nároky na kvalitu živných médií, poměrně dlouhá doba inkubace a zkušenost při odečítání výsledků. Přínosem pro diagnostiku *M. hominis* se stala metoda PCR, kterou lze prokázat DNA nejen živých, ale i mrtvých buněk. I tato metoda má však své nevýhody spojené s bezchybným postupem izolace DNA a možnou kontaminací z vnějšího prostředí. Podstatné je i dostatečné množství mikroorganismů ve vyšetřovaném vzorku, které se nenachází pod detekčním limitem reakce.

Stovnářím metody kultivační s metodou PCR se zabývali Abele-Horn a kol. (1996) a Luki a kol. (1998). Obě vědecké skupiny označily metodu PCR za citlivou a specifickou, vhodnou ke stanovení *M. hominis* v klinickém materiálu. Abele-Horn a kol. (1996) prokázali *M. hominis* metodou PCR v 6 kultivačně negativních vzorcích. Naopak ve dvou kultivačně pozitivních vzorcích mikroorganismy metodou PCR neprokázali. Autoři vysvětlují tuto skutečnost přítomností velkého množství DNA *M. hominis* v těchto vzorcích.

V naší studii bylo dosaženo podobných výsledků. Kultivační metodou bylo z celkového počtu 185 vzorků vykultivováno 29 (15,7 %) kmenů *M. hominis*. Metodou PCR se však nepodařilo mikroorganismy prokázat ve dvou z těchto vzorků. Příčina by mohla být v již zmiňovaném velkém množství DNA *M. hominis*. Naopak metodou PCR byla DNA prokázána v dalších čtyřech vzorcích, které byly kultivační metodou označeny za negativní. V tomto případě je možné, že během transportu či kultivace mohlo dojít k odumření buněk *M. hominis*, nebo mohl vzorek obsahovat již mrtvé buňky *M. hominis*, které byly usmrceny např. antibiotickou léčbou.

V naší i obou zmiňovaných studiích byly k PCR diagnostice použity primery navržené Blanchardem a kol. (1993), které jsou specifické pro oblast genu 16S rRNA *M. hominis*.

Citlivost reakce stanovili Blanchard a kol. (1993) v rozmezí 10 až 15 fg DNA. Abele-Horn a kol. (1996) stanovili detekční limit reakce na 40 fg. Výsledky obou studií uvádějí nižší detekční limit než byl stanoven v naší studii. Po předchozí optimalizaci reakce bylo možné stanovit DNA do koncentrace 0,56 pg.

K průkazu nižší koncentrace DNA byla zavedena další detekční metoda, kterou je RT-PCR. Tato velmi citlivá metoda umožňuje nejen stanovení velmi malých koncentrací DNA ve vzorku, ale také stanovení přesného počtu kopií DNA. Využitím této metody v diagnostice *M. hominis* se jako první zabývali Baczynska a kol. (2004), kteří navrhli primery specifické pro oblast genu kódujícího enzym glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasu a dvě fluorescenčně značené sondy. Metodu RT-PCR optimalizovali k detekci 5 kopií genomické DNA referenčního kmene *M. hominis* PG 21.

Metoda RT-PCR byla v naší laboratoři zavedena pro průkaz DNA *M. hominis* ve vzorcích amniové tekutiny. Z ekonomických důvodů byla vybrána pouze jedna sonda, která byla značena na obou koncích, tzn. byla vytvořena TaqMan sonda. Metoda RT-PCR byla optimalizována k detekci 40 kopií DNA *M. hominis*. Detekce nejnižší koncentrace, tzn. 4 kopií byla úspěšná v sedmi z deseti pokusů.

Vzorky amniové tekutiny byly nejprve zpracovány kultivační metodou, kterou bylo prokázáno *M. hominis* ve 21 (10,4 %) z 202 vzorků. Stejný počet vzorků byl vyšetřen i metodou RT-PCR. DNA *M. hominis* byla prokázána v 51 (25,2 %) vzorcích. Hlavním důvodem rozdílu ve výsledcích obou metod byla vyšší citlivost metody RT-PCR, kterou lze stanovit i velmi nízké koncentrace DNA. Tato metoda prokazuje i DNA mrtvých buněk, což kultivační metoda neumožňuje. Odumření *M. hominis* ve vzorcích mohlo být způsobeno delším časovým rozmezím mezi odběrem amniové tekutiny a kultivačním zpracováním v laboratoři. Další možnou příčinou by mohl být průkaz DNA mikroorganismů usmrcených imunitním systémem již v těle matky. Toto zdůvodnění by mohla podpořit skutečnost, že téměř všechny vzorky, které byly prokázány pouze metodou RT-PCR měly detekovaný malý počet kopií DNA *M. hominis* v porovnání se vzorky prokazanými i metodou kultivační.

Jak již bylo zmíněno, metoda RT-PCR umožňuje nejen detekci, ale také určení přesného počtu kopií DNA *M. hominis* ve vyšetřovaných vzorcích. Největší počet kopií DNA byl stanoven ve třech vzorcích, u kterých hodnoty přesáhly 1 000 000. Ve všech těchto vzorcích byly prokázány kultivační metodou velké počty kolonií narostlých na agarových médiích.

Kappa koeficient byl využit k porovnání metody kultivační a RT-PCR. Získaná hodnota 0,511 kappa koeficientu udává střední shodu obou použitých metod. Koeficient kappa vyjadřuje velikost dosažené shody použitých metod. Kappa větší než 0 ukazuje na lepší shodu než

očekávanou a maximální hodnota koeficientu ($\kappa = 1,0$) odpovídá absolutní shodě ve výsledcích.

Výsledky získané oběma metodami byly vyhodnoceny ve vztahu k délce těhotenství a porodní váze novorozence.

Problematikou výskytu *M. hominis* ve vztahu k délce těhotenství se zabývali také Kataoka a kol. (2006). *M. hominis* prokázali v 11 % vyšetřených vzorků amniových tekutin. Tato hodnota je zcela shodná s výsledkem získaným v této studii (10,4 %).

Kataoka a kol. (2006) také prokázali *M. hominis* v 19 % vzorků žen, které porodily před 34. týdnem těhotenství. V odborné literatuře jsou za předčasný porod označovány týdny před 37. týdnem. Výsledky publikované Kataokou a kol. (2006) jsou odlišné od výsledků uvedených v této studii. Z celkového počtu 202 vyšetřených žen porodilo před 37. týdnem pouze 10 žen. U jedné z nich bylo v amniové tekutině kultivační metodou prokázáno *M. hominis*.

Průkazem *M. hominis* v amniové tekutině se zabývali také Sperling a kol. (1988), kteří tento druh vykultivovali z 30 % vyšetřených vzorků. Autoři uvádějí, že 37,8 % žen pozitivních na přítomnost *M. hominis* porodilo novorozence s váhou nižší než 2 500 g. Děti, jejichž hmotnost byla vyšší než 2 500 g, porodilo 29,7 % žen pozitivních na přítomnost *M. hominis*. Ve studii Sperlinga a kol. (1988) nebyla zjištěna statistická významnost mezi výskytem *M. hominis* a nízkou porodní váhou. V naší studii se z 21 žen, v jejichž amniové tekutině bylo *M. hominis* prokázáno, pouze jedné narodilo dítě s porodní váhou 2 460 g. Ostatních 20 žen s pozitivním nálezem *M. hominis* porodilo děti s hmotností přesahující 2 500 g.

Metodou RT-PCR bylo *M. hominis* prokázáno u jedné ženy z deseti, které porodily před 37. týdnem těhotenství. Oproti metodě kultivační, bylo *M. hominis* prokázáno metodou RT-PCR u dvou novorozenců, jejichž porodní váha byla nižší než 2 500 g.

K posouzení souvislosti mezi výskytem *M. hominis* a délkou těhotenství nebo porodní váhou novorozence, byl použit Fischerův přesný test. Shodně se studii Sperlinga a kol. (1988) nebyla v této studii zjištěna statistická významnost.

Dále byl využit Spearmanův korelační koeficient ke zjištění vztahu týdne odběru na počtu kopií stanovených metodou RT-PCR. Nebyla zde zjištěna lineární souvislost, tzn. že počet kopií nebyl závislý na týdnu odběru amniové tekutiny.

Správné určení původce, případně původců infekčního onemocnění genitálního ústrojí a jejich citlivosti na antibiotika, je základním předpokladem úspěšné antibiotické terapie. K léčbě infekcí vyvolaných *M. hominis* se nejčastěji používají tetracyklinová antibiotika. Dříve doporučovaný tetracyklin je v současnosti nahrazován doxycyklinem z důvodu zvyšujícího

se výskytu rezistentních kmenů *M. hominis* k tetracyklinu. Citlivost na doxycyklin byla v této studii zjišťována u 121 kmenů *M. hominis*. Z výsledků vyplývá, že 90 % kmenů bylo inhibováno doxycyklinem v koncentraci 0,5 mg/l. Hannan a kol. (2000) uvádějí MIC₉₀ doxycyklinu 1 mg/l. Nižší účinnou koncentrací doxycyklinu MIC₉₀ 0,12 mg/l zjistili Bébear a kol (2000b). Nejnižší hodnoty zaznamenali Samra a kol. (2002), kteří uvádějí 90 % testovaných kmenů *M. hominis* inhibovaných doxycyklinem v koncentraci 0,064 mg/l. Autoři stanovili tuto hodnotu E-testem.

V současnosti se již objevují zprávy o kmenech *M. hominis* rezistentních k doxycyklinu. Bébear a kol. (2000a) zjišťovali účinnou koncentraci doxycyklinu na rezistentní kmeny *M. hominis*. Autoři uvádějí, že MIC₉₀ těchto kmenů dosahovala hodnoty 16 mg/l doxycyklinu. Z námi testovaných 121 kmenů byly pouze dva rezistentní k doxycyklinu. Jejich MIC₉₀ přesahovala 8 mg/l, což byla nejvyšší námi testovaná koncentrace.

Další skupinou antibiotik vhodných k léčbě infekcí *M. hominis* jsou fluorochinolony. Zkumavkovou diluční metodou byla stanovena MIC₉₀ ofloxacinu i ciprofloxacinu, která byla 2 mg/l. Pouze dva kmeny vykazovaly rezistenci na ofloxacin ≥ 8 mg/l. Stejnou hodnotu MIC₉₀ 2 mg/l pro ofloxacin uvádějí Ullmann a kol. (1999) a pro ciprofloxacin Kenny and Cartwright (2001). Nižší hodnoty 0,5 a 1 mg/l ofloxacinu zjistili Bébear a kol. (2000a,b). Tyto nižší výsledky by mohly být způsobeny jinou použitou metodou, kterou byla agarová diluční metoda. Obdobné hodnoty pro ciprofloxacin publikovali Ngan a kol. (2004), 0,5 mg/l a Bébear a kol. (2000b), 1 mg/l. Kilic a kol. (2004) uvádějí 12,5 % kmenů rezistentních k ofloxacinu. Oproti tomu Domingues a kol. (2003) neprokázali rezistenci k tomuto antibiotiku u žádného z testovaných kmenů.

Dále byla zjišťována citlivost izolovaných kmenů k linkomycinu. Devadesát procent kmenů bylo inhibováno linkomycinem o koncentraci 2 mg/l. Účinností linkomycinu na *M. hominis* se zabývali pouze Taylor-Robinson a Bébear (1997), kteří uvádějí MIC₉₀ > 1 mg/l.

Posledním testovaným antibiotikem v této studii byl erytromycin. Přestože je erytromycin na *M. hominis* téměř neúčinný, je stále používán k léčbě infekcí genitálního ústrojí, zvláště u těhotných žen. Ze 121 testovaných kmenů vyrůstalo 50 % z nich v médiu obsahujícím erytromycin v koncentraci nižší než 500 mg/l. Podle údajů, které publikovali Bébear a kol. (2000b) byla MIC₉₀ erytromycinu > 64 mg/l. Hannan a kol. (2000) uvádějí MIC₉₀ erytromycinu ≥ 100 mg/l.

6 Závěr

Infekční onemocnění genitálního ústrojí žen je aktuální problematikou řešenou celosvětově. Změny vyvolané různými mikroorganismy v pohlavních orgánech negativně ovlivňují nejen zdravotní stav pacientky, příp. vyvíjejícího se plodu či novorozence, ale také její fertilitu. Proto byla tato práce zaměřena na studium výskytu *M. hominis* v genitálním ústrojí žen, především ve vztahu k zdravotnímu stavu pacientek, příp. jejich novorozenců, dále ve vztahu k věku a používané antikoncepci. Předpokladem realizace uvedeného záměru bylo zavedení metod pro diagnostiku mykoplazmat, včetně stanovení jejich citlivosti na antibiotika.

V jednotlivých etapách bylo dosaženo následujících výsledků:

Pro kultivaci *M. hominis* se osvědčily PPLO agar a PPLO bujón firmy Difco, obohacené koňským sérem a čerstvým kvasnicovým extraktem. Půdy dále obsahovaly ampicilin a octan thallný z důvodu inhibice nežádoucích mikroorganismů. Za účelem vizualizace růstu byly do tekuté půdy přidávány arginin a fenolová červeň.

Optimální inkubační podmínky odpovídaly prostředí s 5 % CO₂ a teplotě 37 °C. Doba inkubace byla 48 - 72 °C. Za těchto podmínek vyrůstalo *M. hominis* na agarových půdách v charakteristických koloniích tvaru sázeného vejce. Růst v tekutých médiích signalizovala změna zabarvení obsahu zkumavky z oranžové na tmavě růžovou.

Byl vypracován postup transportu a zpracování vyšetřovaných vzorků v laboratoři. Tampónové stěry byly dodávány ve zkumavkách s transportním médiem - PPLO bujón bez argininu a fenolové červeň. Samostatně byl zpracován odběrový tampon a transportní médium. Zvolený postup zpracování vzorků se osvědčil jako nejvhodnější s nejmenší pravděpodobností falešných výsledků.

Dále byla zavedena metoda PCR. K průkazu specifického úseku genu 16S rRNA *M. hominis* byly využity primery navržené Blanchardem a kol. (1993). PCR reakce byla optimalizována tak, aby byl získán co nejnižší detekční limit. Po úpravě koncentrace Mg²⁺ v reakční směsi na hodnotu 2 mmol/l a stanovení vhodné teploty annealingu (62 °C) byl dosažen detekční limit 0,56 pg.

Kultivační metoda i metoda PCR byly využity k průkazu *M. hominis* ve vzorcích odebraných z krčku děložního náhodně vybraných žen. Celkem bylo vyšetřeno 771 stěrů z cervixu stejného počtu náhodně vybraných žen. Kultivační metodou bylo *M. hominis* prokázáno ve 133 (17,3 %) vzorcích.

Metodou PCR bylo vyšetřeno 185 vzorků transportních médií, v nichž byly stěry dopraveny do laboratoře. V 31 (16,8 %) případech byla detekována DNA *M. hominis*. Kultivační metodou bylo *M. hominis* prokázáno ve 27 (14,6 %) vzorcích transportních médií. Metodou PCR byla

DNA *M. hominis* prokázána ve 4 vzorcích, které byly kultivační technikou označeny jako negativní.

Kultivační metodou bylo naopak ze 185 vzorků vykultivováno 29 kmenů *M. hominis*, z nichž dva se nepodařilo identifikovat metodou PCR.

Při vyhodnocení nálezu *M. hominis* ve vztahu k stávající diagnóze žen byl tento mikroorganismus prokázán u 8 (28,6 %) žen s amenoreou, 24 (24,5 %) těhotných žen, 27 (19,7 %) žen s prekancerózami a 25 (18,7 %) žen bez obtíží. Výskyt *M. hominis* ve vztahu k používané antikoncepci byl nejvyšší u žen se zavedeným nitroděložním tělískem 5 (18,5 %). Ženy užívající hormonální antikoncepci byly kolonizovány *M. hominis* v 15,9 % a ženy bez antikoncepce v 16,2 %. V rámci věkových kategorií byl nejvyšší výskyt *M. hominis* zaznamenán ve skupině žen ve věku 31 – 40 let (19,8 %).

Z vyšetřených 202 vzorků amniové tekutiny, odebrané ženám v 15. - 22. týdnu těhotenství, bylo *M. hominis* vykultivováno z 21 (10,4 %) vzorků. Ženy s pozitivním nálezem porodily po 37. týdnu těhotenství zdravé novorozence s váhou vyšší než 2 500 g. Pouze jedna porodila v 37. týdnu těhotenství a jedna žena porodila dítě s váhou 2 460 g.

Další zavedenou metodou byla RT-PCR. Tato velmi citlivá metoda umožňuje stanovení i velmi malého množství DNA ve vyšetřovaném vzorku. Byla provedena optimalizace metody pro průkaz DNA *M. hominis* podle Baczynske a kol. (2004). Od uvedených autorů byly převzaty sekvence primerů a z ekonomických důvodů pouze jeden typ sondy. Tato sonda byla na obou koncích označena fluorescenčními barvivy, což se obecně označuje jako TaqMan sonda. Detekční limit, zjištěný po optimalizaci RT-PCR, byl 40 kopií v jednom mikrolitru.

Metodou RT-PCR byla DNA *M. hominis* prokázána v 51 (25,2 %) vzorcích amniové tekutiny. Z uvedeného počtu žen s pozitivním nálezem *M. hominis* v amniové tekutině dvě porodily v řádném termínu novorozence jejichž váha byla nižší než 2 500 g. Jedna žena porodila v 37. týdnu těhotenství novorozence o hmotnosti 2 500g.

Velmi významnou součástí laboratorního vyšetření je stanovení citlivosti na antibakteriální léčiva. Účinnost doxycyklinu, ciprofloxacinu, ofloxacinu, linkomycinu a erytromycinu byla testována na 121 kmenů *M. hominis*. Jeden kmen byl rezistentní k doxycyklinu ($MIC \geq 8$), jeden k ofloxacinu ($MIC \geq 8$) a jeden k oběma zmiňovaným antibiotikům ($MIC \geq 8$).

Všechny kmeny byly citlivé k ciprofloxacinu (MIC_{90} 2 mg/l) a linkomycinu (MIC_{90} 2 mg/l). MIC_{90} doxycyklinu byla u citlivých kmenů 0,5 mg/l. Ofloxacin inhiboval 90 % kmenů v koncentraci 2 mg/l. K erytromycinu byly všechny testované kmeny vysoce rezistentní. MIC_{90} tohoto antibiotika dosahovala hodnoty 1 000 mg/l.

Z dosažených výsledků vyplývají následující doporučení.

Průkaz *M. hominis* ve stěru z krčku děložního by měl být prováděn vždy, pokud žena pociťuje netypickou bolest v podbříšku spojenou se změnou poševního prostředí, nebo u ženy se zánětlivým onemocněním pohlavních orgánů. Pokud dochází u ženy k opakovaným zánětlivým změnám spojeným s výskytem *M. hominis*, je vhodné vyšetřit a případně léčit i partnera ženy.

U těhotných žen by měl být prováděn průkaz *M. hominis* vždy, když se projeví změna poševní mikroflóry. Pokud je indikován odběr amniové tekutiny pro genetické vyšetření, je vhodné jej doplnit také mikrobiologickým vyšetřením, jehož součástí by měl být průkaz *M. hominis*. Zjišťování výskytu tohoto mikroorganismu je vhodné provádět u předčasně narozených dětí, dětí s nízkou porodní váhou a dětí s rozvíjející se poporodní bakteriální infekcí z důvodu zavedení účinné terapie. Opomenuty by však neměly zůstat ani matky těchto dětí.

Výběr vhodné antibiotické terapie by se vždy měl opírat o výsledky stanovené citlivosti příslušného kmene *M. hominis* na antibakteriální léčiva. Důvodem je narůstající rezistence *M. hominis*, především na tetracyklinová antibiotika. Opomíjena by neměla být ani již známá rezistence *M. hominis* k erytromycinu, často užívanému k léčbě těhotných žen.

V diagnostice *M. hominis* stále dominuje kulturační vyšetření. Spolehlivých a rychlých výsledků lze dosáhnout také metodami PCR a RT-PCR, které však dosud nejsou v diagnostice *M. hominis* běžně používány. V budoucnu by bylo vhodné využít obě metody k průkazu nejenom *M. hominis*, ale také *U. urealyticum* a *C. trachomatis* v jednom kroku.

Na závěr je nutné zdůraznit, že přítomnost *M. hominis* na sliznici genitálního ústrojí ženy nemusí vždy vést ke vzniku zánětlivého onemocnění. Podíl tohoto mikroorganismu na rozvoji zánětlivých změn souvisí nejenom se složením poševní mikroflóry, ale především se zdravotním stavem ženy. Antibiotická terapie by proto měla být indikována s individuálním přístupem ke každé pacientce.

Seznam literatury

- ABELE-HORN, M. et al. Polymerase chain reaction versus culture for detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in the urogenital tract of adults and the respiratory tract of newborns. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, July 1996, vol. 15, no. 7, s. 595-598. ISBN: 0934-9723.
- ARYA, O.P., et al. Is *Mycoplasma hominis* a vaginal pathogen? *Sexually Transmitted Infections*, February 2001, vol. 77, no. 1, s. 58-62. ISSN: 1368-4973.
- BACZYNSKA, A., et al. Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. *BMC Microbiology*, September 2004, vol. 4, no. 35, s. 1-13. ISSN: 1471-2180.
- BACZYNSKA, A., et al. Morphology of human Fallopian tubes after infection with *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* in vitro organ culture study. *Human Reproduction*, April 2007, vol. 22, no. 4, s. 968-979. ISSN: 0268-1161.
- BÉBÉAR, C.M., et al. 2000a Comparative activities to telithromycin (HMR 3647), levofloxacin and other antimicrobial agents against human mycoplasmas. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, July 2000, vol. 44, no. 7, s. 1980-1982. ISSN: 0066-4804.
- BÉBÉAR, C.M., et al. 2000b In vitro activity of trovafloxacin compared to those of five antimicrobials against Mycoplasmas including *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* fluoroquinolone –resistant isolates that have been genetically characterized. *Antimicrobial agent and chemotherapy*, September 2000, vol. 44, no. 9, s. 2557-2560. ISSN: 0066-4804.
- BELKUM, A., et al. A clinical study on the association of *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma hominis* infections in women attending a sexually transmitted disease (STD) outpatient clinic. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, December 2001, vol. 32, no. 1, 27-32. ISSN: 0928-8244.
- BLANCHARD, A., et al. Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16S rRNA gene of *Mycoplasma hominis* and detection by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, May 1993, vol. 31, no. 5, s. 1358-1361. ISSN: 0095-1137.
- BUČEK, R – UNZEITIG, V. – OBDRŽÁLEK, V. Izolace mykoplazmat z genitálu žen. *Československá epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*, December 1989, vol. 38, no. 6, s. 330-336. ISSN: 0009-0522.

CEDILLO-RAMÍREZ, L., et al. Association of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* with some indicators of nonspecific vaginitis. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 2000, vol. 42, no. 1, s. 1-6. ISSN: 0187-4640.

DOMINGUES, D., et al. Genital mycoplasmas in women attending a family planning clinic in Guiné-Bassau and their susceptibility to antimicrobial agents. *Acta Tropica*, April 2003, vol. 86, no. 1, s. 19-24. ISSN: 0001-706X.

EMBIL, J.A. – PEREIRA, L.H. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and genital mycoplasmas in asymptomatic women. *Canadian Medical Association journal*, July 1985, vol. 133, no. 1, s. 34-35. ISSN: 0008-4409.

FENKCI, V. - YILMAZER, M. - AKTEPE, O.C. Have *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections any significant effect on women fertility? *Le infezioni in medicina*, December 2002, vol. 10, no. 4, s. 220-223. ISSN: 1124-9390.

GUVEN, M.A., et al. Prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections in the unexplained infertile women. *Archives of gynecology and obstetrics*. September 2007, vol. 276, no. 3, s. 219-223. ISSN: 0932-0067.

HANNAN, P.C.T. – WOODNUTT, G. In vitro activity of gemifloxacin (SB 265805; LB20304a) against human mycoplasmas. *The journal of antimicrobial chemotherapy*, March 2000, vol. 45, no. 3, s. 367-369. ISSN: 0305-7453.

HIRAI, Y., et al. An indirect immunofluorescence method for detection of *Mycoplasma hominis* in vaginal smears. *Microbiology and immunology*, 1991, vol. 35, no. 10, s. 831-839. ISSN: 0385-5600.

CHUA, K.B., et al. *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. ISSN: 0037-5675.

KATAOKA, S., et al. Association between preterm birth and vaginal colonization by mycoplasmas in early pregnancy. *Journal of clinical microbiology*, January 2006, vol. 44, no. 1, s. 51-55. ISSN: 0095-1137.

KENNY, G.E. – CARTWRIGHT, F.D. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Ureaplasma urealyticum* to GAR-936, Dalfofpristin, Dirithromycin, Evernimicin, Gatifloxacin, Linezolid, Moxifloxacin, Quinupristin-Dalfopristin and Telitromycin

compared to their susceptibilities to reference Macrolides, Tetracyclines and Quinolones. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, September 2001, vol. 45, no. 9, s. 2604-2608. ISSN: 0066-4804.

KILIC, D., et al. Prevalence and treatment of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Mycoplasma hominis* in patients with non-gonococcal urethritis. *Japanese journal of infectious diseases*, February 2004, vol. 57, no. 1, s. 17-20. ISSN: 1344-6304.

LAMONT, R.F., et al. The role of mycoplasmas, ureaplasmas and chlamydiae in the genital tract of women presenting in spontaneous early preterm labour. *Journal of medical microbiology*, November 1987, vol. 24, no. 3, s. 253-257. ISSN: 0022-2615.

LUKI, N. et al. Comparison of polymerase chain reaction assay with culture for detection of genital mycoplasmas perinatal infections. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, April 1998, vol. 17, no. 4, s. 255-263. ISBN: 0934-9723.

NGAN, C.C., et al. Susceptibility testing of Singapore strains of *Mycoplasma hominis* to tetracycline, gatifloxacin, moxifloxacin, ciprofloxacin, clindamycin, and azithromycin by Etest method. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, March 2004, vol. 48, no. 3, s. 207-210. ISSN: 0732-8893.

SAMRA, Z. - SOFFER, Y. - PANSKY, M. Prevalence of genital chlamydia and mycoplasma infection in couples attending a male infertility clinic. *European journal of epidemiology*, February 1994, vol. 10, no. 1., s. 69-73. ISSN: 0393-2990.

SAMRA, Z. – ROSENBERG, S. – SOFFER, Y. In vitro susceptibility of *Mycoplasma hominis* clinical isolates to tetracycline, quinolones and macrolides. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, December 2002, vol. 44, no. 4, s. 359-361. ISSN: 0732-8893.

SCHLICHT, M.J., et al. High prevalence of genital mycoplasmas among sexually active young adults with urethritis or cervicitis symptoms in La Crosse, Wisconsin. *Journal of clinical microbiology*, October 2004, vol. 42, no. 10, s. 4636-4640. ISSN: 0095-1137.

SPELRLING, R.S. – NEWTON, E. – GIBBS, R.S. Intraamniotic infection in low birth-weight infants. *The Journal of infectious diseases*, January 1988, vol. 157, no. 1, s. 113-117. ISSN: 0022-1899.

TAYLOR-ROBINSON, D. – BÉBÉAR, C. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, November 1997, vol. 40, no. 5, s. 622-630. ISSN: 0066-4804.

ULLMANN, U. – SCHUBERT, S. – KRAUSSE, R. Comparative in-vitro of levofloxacin, other fluoroquinolones, doxycycline and erythromycin against *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, June 1999, vol. 43, s. 33-36. ISSN: 0305-7453.

Seznam zkratk

A	adenin
ASCUS	neurčitě epitelové atypie (Atypical Squamous Cell of Undetermined Significance)
BV	bakteriální vaginóza (Bacterial Vaginosis)
C	cytosin
CIN I	cervikální intraepitelové neoplazie 1. stupně (Cervical Intraepithelial Neoplasia)
CIN II	cervikální intraepitelové neoplazie 2. stupně (Cervical Intraepithelial Neoplasia)
CIN III	cervikální intraepitelové neoplazie 3. stupně (Cervical Intraepithelial Neoplasia)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
G	guanin
<i>G.</i>	<i>Gardnerella</i>
H-SIL	skvamózní intraepitelové léze vysokého stupně (High Grade Squamous Intraepithelial Lesions)
LEEP	excize vysokofrekvenční kličkou (Loop Electrical Excision Procedure)
L-SIL	skvamózní intraepitelové léze nízkého stupně (Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions)
<i>M.</i>	<i>Mycoplasma</i>
MIC	minimální inhibiční koncentrace (Minimum Inhibitory Concentration)
PCR	polymerasová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PPLO	mikroorganismy způsobující pleuropneumonii (Pleuro-Pneumonia-Like Organisms)
RT-PCR	polymerasová řetězová reakce v reálném čase (Real-Time Polymerase Chain Reaction)
susp.	suspektní
T	thymin
<i>U.</i>	<i>Ureaplasma</i>

Publikační činnost autora

Původní články

LYSKOVA, P. – VYDRZALOVA, M. – KRALOVCOVA, D. – MAZUROVA, J. Prevalence and characteristics of *Streptococcus canis* strains isolated from dogs and cats. *Acta Veterinaria Brno*, 2007. ISSN: 0001-7213 - v tisku. IF 0.491

LYSKOVA, P. – VYDRZALOVA, M. – MAZUROVA, J. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. *Journal of veterinary medicine A*, 2007, vol. 54, s. 559-563. ISSN: 0931-184X. IF 0.627

MAZUROVA, J. – LYSKOVA, P. – VYDRZALOVA, M. – CAPKOVA, M. – KROUPA, T. Bactericidal activity of natural substance on microorganisms contaminating boar semen. *Research in pig breeding*, 2007, vol. 1, no. 1, s. 51-53. ISSN: 1802-7547.

VYDRZALOVA, M. – LYSKOVA, P. – MAZUROVA, J. *Mycoplasma hominis* in female genital tract and its susceptibility to antibiotics. *Scientific Paper of The University of Pardubice*, 2006, vol. 12, s. 21–28. ISSN: 1211-5541.

MAZUROVA, J. - HRDINOVA M. - LYSKOVA P. Enterococci of canine origin and their characteristics. *Scientific Paper of The University of Pardubice*, 2005, vol. 11, s. 33-44. ISSN: 1211-5541.

HRDINOVA, M. – LYSKOVA, P. – MAZUROVA, J. *Mycoplasma hominis* in female genital tract. *5th International Conference for Ph.D. Students*, 2005, vol. 5, s. 173-176 ISBN: 9636616809.

Přehledové články

HRDINOVA, M. *Mycoplasma hominis* v genitálním ústrojí žen. *Acta Medica Supplementum*, 2005, vol. 48, s. 73-76. ISSN: 1211-247X.

Abstrakta

VYDRZALOVA, M. – LYSKOVA, P. – MAZUROVA, J. Occurrence of *Mycoplasma hominis* in amniotic fluid of pregnant women. In *17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Munich, 2007. ISSN: 1198-743X.

LYSKOVA, P. – VYDRZALOVA, M. – KROUPA, T. - MAZUROVA, J. Group G beta-haemolytic streptococci of human and animal origin. In *17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Munich, 2007. ISSN: 1198-743X.

- VYDRŽALOVÁ, M. – LYSKOVÁ, P. – MAZUROVÁ, J. *Gardnerella vaginalis* v genitálním ústrojí žen. *Bulletin Československé společnosti mikrobiologické*, Liberec, 2007, vol. 48, s. 128. ISSN: 0009-0646.
- LYSKOVÁ, P. – MAZUROVÁ, J. – VYDRŽALOVÁ, M. – VANČATOVÁ, I. Bacteria and fungi in dogs with otitis externa. *Bulletin Československé společnosti mikrobiologické*, Liberec, 2007, vol. 48, s. 242. ISSN: 0009-0646.
- LYSKOVÁ, P. – MAZUROVÁ, J. – VYDRŽALOVÁ, M. – VANČATOVÁ, I. *Malassezia pachydermatis* a otitidy u psů. Sborník abstraktů 4. Česko-Slovenská konference lékařské mykologie, Pardubice, 2007, s. 76. ISBN: 978-80-239-9306-6.
- MAZUROVA, J. – LYSKOVA, P. – SOSOVICKOVA, P. – HRDINOVA, M. Effect of natural substance on microorganisms. *Reproduction in Domestic Animals*, Slovinsko, 2006, vol. 41, s. 321. ISSN: 0936-6768.
- HRDINOVA, M. – LYSKOVA, P. – MAZUROVA, J. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in female genital tract. *Federation of European Microbiological Societies*, Madrid, 2006, s. 140. ISSN: 0378-1097.
- HRDINOVA, M. – LYSKOVA, P. – MAZUROVA, J. *Mycoplasma hominis* v genitálním ústrojí neplodných žen. *XIV. Tomáškovy dny*, Brno, 2005.
- LYSKOVÁ, P. – MAZUROVÁ, J. – HRDINOVÁ, M. Vlastnosti streptokoků se skupinovým antigenem G ve vzorcích ze zvířat a lidí. *XIV. Tomáškovy dny*, Brno, 2005.
- STRŽÍTESKÁ, D. – HRDINOVÁ, M. Detekce *Mycoplasma hominis* komerčními sety Mycoplasma DUO. *XIV. Tomáškovy dny*, Brno, 2005.
- MAZUROVA, J. – LYSKOVA, P. – HRDINOVA, M. – CEROVSKY, J. The effects of some antibiotics on microorganisms contaminating boar ejaculates. *Pig reproduction and Natural Additives*, Kostelec nad Orlicí, 2004.
- HRDINOVA, M. – MAZUROVA, J. – LYSKOVA, P. Výskyt *Mycoplasma hominis* v genitálním ústrojí žen. *23rd Kongres Československé společnosti mikrobiologické*, Brno, 2004.
- HRDINOVÁ, M. – MAZUROVÁ, J. – LYSKOVÁ, P. – VRZALÍKOVÁ, K. - ŠULOVÁ M. Citlivost *Mycoplasma hominis* na antibakteriální léčiva. *XIII. Tomáškovy dny*, Brno, 2004.

HRDINOVA, M. – MAZUROVA, J. Occurance of *Enterococcus* species at dogs and their susceptibility to antibiotics. *Scripta Medica*, 2004, vol. 77, no. 2, s. 122. ISSN: 1211-3395.

HRDINOVA, M. – MAZUROVA, J. *Mycoplasma hominis* in the genital tract of women. In *14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Praha, 2004, vol. 10, no. 3, s. 617. ISSN: 1198-743X.

MAZUROVÁ, J. – HRDINOVÁ, M. – LYSKOVÁ, P. – MAZÚROVÁ, J. - ŠEJNOHOVÁ D. Group G streptococci of animal and human origin. *XII. Moravsko-slovenské mikrobiologické dni*, Tatranská Lomnice, Slovakia, 2004.

HRDINOVÁ, M. – MAZUROVÁ, J. *Výskyt enterokoků u psů a jejich citlivost na antibakteriální léčiva*. XI. *Tomáškovy dny*, Brno, 2002.

Přednášky

HRDINOVÁ, M. – PASZKOVÁ, E. – MAZUROVÁ, J. *Mycoplasma hominis* v genitálním ústrojí žen. *XII. Tomáškovy dny*, Brno, 2003.