

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

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

Disertační práce

Mgr. Markéta Vydržalová

Pardubice 2007

Charles University in Prague
Faculty of Medicine in Hradec Králové

***Mycoplasma hominis* in female genital tract**

Doctoral thesis

Mgr. Markéta Vydržalová

Pardubice 2007

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Pardubicích 5.12.2007

Mgr. Markéta Vydržalová

Poděkování

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala doc. MVDr. Jaroslavě Mazurové, CSc. za odborné vedení a cenné rady při zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala paní doc. MUDr. Olze Ryškové, CSc. za odborné rady a umožnění doktorského studia v oboru lékařské mikrobiologie na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Mé poděkování patří také všem lékařům, kteří se podíleli na odběru vzorků. Bez jejich ochoty by tato práce nemohla vzniknout. Jmenovitě MUDr. Věře Jüttnerové (Oddělení lékařské genetiky, Hradec Králové), kolektivu lékařů soukromého gynekologického ústavu G-MED, dále bývalému primáři Krajské nemocnice Pardubice MUDr. Ladislavu Hanouskovi a lékařům provozujícím soukromou gynekologickou praxi MUDr. Marku Dobrkovskému a MUDr. Pavlu Slaninovi. Za statistické zpracování výsledků děkuji RNDr. Evě Čermákové. Dále bych ráda poděkovala svým kolegyním Mgr. Petře Lyskové a RNDr. Ditě Královcové za cenné rady během zpracování této práce. Za odborné rady týkající se metody real-time PCR děkuji MUDr. Zdeňku Fiedlerovi, PhD. Děkuji také laborantce Martině Ulrichové za pomoc v laboratoři.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům a manželovi za oporu, kterou mi byli po celou dobu mého studia.

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 kultivační 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 %). Kultivační 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 kultivační metodou a z 51 (25,2 %) vzorků metodou RT-PCR. Získané výsledky byly vyhodnoceny ve vztahu k délce těhotenství a porodní váze novorozence.

Ženy kultivačně 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 hominis* byly rezistentní k erytromycinu ($MIC_{90} 1\ 000\text{mg/l}$). 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 ($MIC \geq 8$) and two (1.7 %) strains to ofloxacin ($MIC \geq 8$). All isolates were highly resistant to erythromycin ($MIC_{90} = 1000$ 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.

Seznam zkratek

A	adenin
ASCUS	neurčité epitelové atypie (Atypical Squamous Cell of Undetermined Significance)
BV	bakteriální vaginóza (Bacterial Vaginosis)
C	cytosin
<i>C.</i>	<i>Chlamydia</i>
CIN I	cervikální intraepitelové neoplazie 1. stupně (Cervical Intraepithelial Neoplazia)
CIN II	cervikální intraepitelové neoplazie 2. stupně (Cervical Intraepithelial Neoplazia)
CIN III	cervikální intraepitelové neoplazie 3. stupně (Cervical Intraepithelial Neoplazia)
Ct	práh cyklu (cycle treshold)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ELISA	test enzymové imunoanalýzy (Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay)
G	guanin
<i>G.</i>	<i>Gardnerella</i>
H-SIL	skvamózní intraepitelové léze vysokého stupně (High Grade Squamous Intraepithelial Lesions)
IFT	imunofluorescenční test
kb	1 000 párů bází
KFT	komplement fixační test
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)
MIT	test inhibice metabolismu
<i>N.</i>	<i>Neisseria</i>
PCR	polymerasová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PID	zánětlivé onemocnění pánve (Pelvic Inflammatory Disease)

PPLO	mikroorganismy způsobující pleuropneumonii (Pleuro-Pneumonia-Like Organisms)
RIT	růstově inhibiční test
RPM	otáčky za minutu (Revolutions Per Minute)
RT-PCR	polymerasová řetězová reakce v reálném čase (Real-Time Polymerase Chain Reaction)
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
sp.	druh (species)
subsp.	poddruh (subspecies)
susp.	suspektní
T	thymin
<i>T.</i>	<i>Trichomonas</i>
<i>U.</i>	<i>Ureaplasma</i>
UV	ultrafialový

Obsah

1	Úvod	13
1.1	Historický pohled na rod <i>Mycoplasma</i>	14
1.2	Taxonomie	14
1.3	Morfologie a struktura	15
1.4	Genetická výbava	15
1.5	Množení mykoplazmat	16
1.6	Antigenní struktura a faktory virulence	16
1.7	Onemocnění vyvolaná <i>Mycoplasma hominis</i>	17
1.7.1	Infekce pohlavních orgánů	17
1.7.2	Výskyt <i>Mycoplasma hominis</i> u těhotných žen	19
1.7.3	Extragenitální infekce	21
1.8	Metody průkazu <i>Mycoplasma hominis</i>	21
1.8.1	Vyšetřovaný materiál	22
1.8.2	Mikroskopické vyšetření	22
1.8.3	Kultivační metody	23
1.8.4	Růst <i>Mycoplasma hominis</i> na agarových médiích	24
1.8.5	Identifikace <i>Mycoplasma hominis</i>	25
1.8.6	Komerční systémy pro diagnostiku <i>Mycoplasma hominis</i>	25
1.8.7	Sérologická typizace	26
1.8.8	Molekulárně biologické metody	26
1.8.9	Nepřímá diagnostika mykoplazmových infekcí	31
1.9	Citlivost <i>Mycoplasma hominis</i> na antibiotika	32
2	Cíl práce	35
3	Materiál a metody	36
3.1	Vyšetřovaný materiál	36
3.2	Kultivační média	36
3.2.1	Složky pro přípravu kultivačních médií	37
3.2.2	Referenční kmen <i>Mycoplasma hominis</i>	39
3.2.3	Dienesovo barvení	39
3.3	Potřeby pro PCR	39
3.4	Potřeby pro RT-PCR	40
3.5	Přístroje a pomůcky	41
4	Pracovní postup	42
4.1	Vyšetření tampónových stěrů	42
4.1.1	Kultivační vyšetření	42
4.1.2	Polymerasová řetězová reakce	44
4.2	Vyšetření amniové tekutiny	47
4.2.1	Kultivační vyšetření	48
4.2.2	RT-PCR	48
4.3	Testování citlivosti na antibiotika	51
4.4	Statistické zpracování dat	52

5	Výsledky	53
5.1	Růstové vlastnosti <i>Mycoplasma hominis</i>	53
5.2	Stěry z krčku děložního	54
5.2.1	Kultivační vyšetření.....	54
5.2.2	Polymerasová řetězová reakce.....	57
5.3	Amniová tekutina	60
5.3.1	Kultivační vyšetření.....	60
5.3.2	RT-PCR	62
5.4	Citlivost na antibiotika.....	68
6	Diskuse.....	70
7	Závěr	78
	Seznam literatury	81
	Seznam obrázků.....	93
	Seznam tabulek.....	94
	Seznam grafů.....	95
	Seznam příloh	96

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 kyselou 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 nesporeující bakterie, *Mycoplasma (M.) hominis*, *Ureaplasma (U.) urealyticum* a další.

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.

1.1 Historický pohled na rod *Mycoplasma*

První mykoplazmata, později pojmenovaná jako *M. mycoides sub. mycoides* (Freundt, 1955), byla vykultivována v roce 1898 Nocardem a Rouxem z plic dobytka postiženého pleuropneumonií. Do roku 1929 byla spolu s dalšími mikroorganismy, vyskytujícími se při tomto onemocnění, označována jako PPLO. Tato zkratka byla vytvořena z anglického označení „Pleuro-Pneumonia-Like Organisms“ a v překladu znamená mikroorganismy způsobující zánět plicnicice a plic (Cimolai, 2001).

Termín mykoplazma, zavedený Nowakem v roce 1929, vznikl spojením řeckých slov mykes (houba) a plasma (formovaný). Charakterizuje schopnost mykoplazmat vytvářet vláknité struktury a plasticitu jejich povrchové membrány (Taylor-Robinson, 1993; Taylor-Robinson, 1999).

V průběhu 30. a 40. let minulého století vzrostl zájem o mykoplazmata z důvodu jejich zjištění u lidí (Taylor-Robinson, 1993). V uvedeném období Dienes a Edsall (1937) izolovali tyto mikroorganismy z abscesu Bartoliniho žlázy ženy. S největší pravděpodobností se jednalo o druh *M. hominis*.

Eaton studoval v roce 1944 původce tzv. atypické pneumonie lidí. Jelikož tento mikroorganismus procházel bakteriologickými filtry, byl považován za virus a označen jako Eatonovo agens (Eaton, 1944). Až úspěšná kultivace na umělých půdách umožnila zařazení tohoto „agens“ mezi bakterie s označením *M. pneumoniae* (Kagan a kol., 1965).

Mykoplazmata jsou v přírodě velmi rozšířena. Vyskytují se u savců, ptáků, plazů, ryb, členovců i rostlin. Z lidského organismu bylo doposud vykultivováno 17 druhů mykoplazmat (Razin a kol., 1998). Nejčastěji jsou izolovány z respiračního, urogenitálního a střevního traktu, také z krve a synoviální tekutiny (Taylor-Robinson a McCormack, 1980; Taylor-Robinson a kol., 2003; Waites a kol., 2005). V urogenitálním traktu bylo dosud prokázáno 8 druhů mykoplazmat (Waites a kol., 2005).

1.2 Taxonomie

M. hominis patří do rodu *Mycoplasma*, který společně s rodem *Ureaplasma* tvoří čeleď *Mycoplasmataceae*. Tato čeleď náleží do řádu *Mycoplasmatales*, třídy *Mollicutes*.

Označení *Mollicutes* bylo vytvořeno spojením dvou latinských slov, mollis (měkký) a cutis (kůže). Tento název vystihuje plasticitu buněk následkem absence pevné buněčné stěny.

V současné době zahrnuje rod *Mycoplasma* 122 druhů a 4 poddruhy. Typovým druhem je *M. mycoides* subsp. *mycoides*. Mezi druhy podílející se na onemocnění člověka patří *M. genitalium*, *M. pneumoniae*, *M. hominis* a *M. fermentans*.

Rod *Ureaplasma* zahrnuje 7 druhů. Název rodu je odvozen od schopnosti ureaplazmat štěpit ureu. Podle malé velikosti kolonií, které vytvářejí na agarových mediích byly dříve označovány jako T-mykoplazmata (odvozeno z anglického slova tiny = drobný). Typovým druhem rodu je *U. urealyticum*. Druhy patogenní pro člověka jsou *U. urealyticum* a *U. parvum* (<http://www.bacterio.cict.fr./index.html>).

1.3 Morfologie a struktura

Morfologie mykoplazmových buněk závisí na druhu, kultivačních podmínkách a stádiu růstového cyklu. Buňky mykoplazmat jsou pleomorfní. Lze pozorovat kulaté, kokobacilární, prstencovité příp. činkovité tvary, ale také krátká či dlouhá vlákna. V kultuře narostlé na agarovém médiu mají většinou tvary kokoidní (Taylor-Robinson, 1999). Průměr nejmenší kokoidní formy schopné reprodukce je asi 300 nm. Vlákennité formy mohou dosahovat délky až 100 μm a tloušťku 0,4 μm (Razin, 2005).

Mykoplazmata nemají pevnou buněčnou stěnu jako většina ostatních bakterií. Jejich povrch je tvořen třívrstevnou membránou (7,5 – 10 nm) složenou z bílkovin a polysacharidů, které vytvářejí vnitřní a vnější vrstvu. Mezi nimi se nachází vrstva tvořená fosfolipidy a cholesterolem. Cholesterol je významný pro zachování integrity membrány při změnách vnějšího osmotického tlaku (Rottem, 1979).

1.4 Genetická výbava

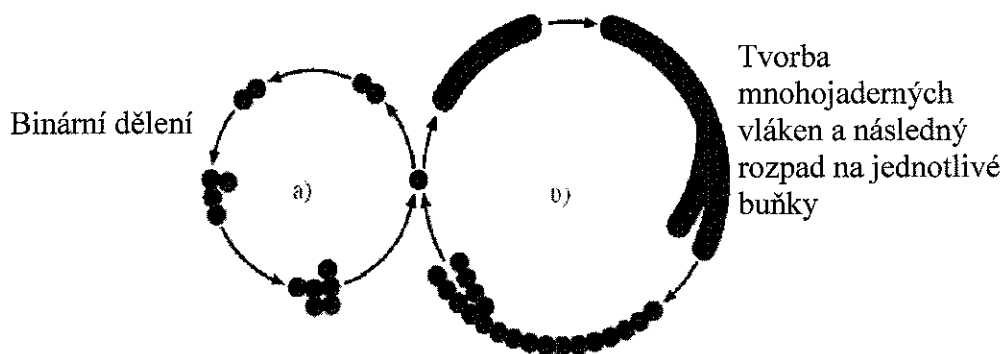
Mykoplazmata mají nejmenší genom ze všech bakterií. Například *M. genitalium* má genom o velikosti 580 kb, což je asi 1/6 genomu *E. coli* (Su a Baseman, 1990).

Genetická informace mykoplazmat je uložena v dvoušroubovicové cirkulární DNA s malým obsahem guaninu a cytosinu (Razin a Freundt, 1984). Obsah těchto bází je u většiny mykoplazmat nízký a pohybuje se v rozmezí 24 – 33 %. Mezi ostatními bakteriemi se podobně nízké hodnoty vyskytují pouze u některých klostridií. To podporuje Razinovu (2005) teorii o jejich fylogenetické příbuznosti s klostridiemi. Jiný názor zastává Maniloff (1996), který uvádí, že se mykoplazmata vyvinula před 590 – 600 milióny let z fylogenetické větve streptokoků s genomem o velikosti 2 000 kb.

Mykoplazmata jsou zajímavá využitím kodonu UGA, který jiné bakterie používají jako stop kodon. U mykoplazmat kóduje aminokyselinu tryptofan (Amikam a kol., 1984).

1.5 Množení mykoplazmat

Mykoplazmata se podobně jako ostatní bakterie množí binárním dělením (obr. 1). V průběhu tohoto procesu však může docházet k opoždění dělení cytoplazmy za dělením jádra (Bredt a kol., 1973; Peterson a kol., 1973). Výsledkem je vznik mnohojaderných vláknitých útvarů, které se mohou dále větvit a připomínat pseudomycelium. Uvnitř vláken se vytvářejí kulovitá tělíska, která jsou od sebe oddělena přepážkami. Vlákna tak nabývají vzhledu řetízků. Po jejich rozpadu na elementární tělíska se celý cyklus opakuje (Razin, 2005).



Obr. 1 Dělení mykoplazmat (Razin, 1981)

1.6 Antigenní struktura a faktory virulence

Mykoplazmata se vyznačují heterogenní strukturou povrchových antigenů, které jim umožňují odolávat složkám imunitního systému (Olson a kol., 1991). *M. hominis* má na svém povrchu proteinové antigeny – Vaa¹, P120², Lmp³ aj.

Vaa antigen je hlavní povrchový protein zajišťující adhezi *M. hominis* k povrchu sliznic. Má schopnost přizpůsobit se prostředí urogenitálního i respiračního ústrojí a také podmínkám uvnitř kloubů (Zhang a Wise, 1996). Jeho proměnlivost podmiňuje odolnost *M. hominis* vůči imunitnímu systému (Boesen a kol., 2001).

Adheze *M. hominis* na povrch epitelu je zprostředkována s největší pravděpodobností také dvěma povrchovými proteiny P50 a P100 (Henrich a kol., 1993).

¹ Zhang a Wise, 1997

² Nyvold a kol., 1997

³ Jensen a kol., 1995; Ladefoged a kol., 1995

P120 je protein složený z hypervariabilní a semivariabilní domény. Obě domény podléhají spontánním mutacím, což je příčinou jeho antigenní variability (Zhang a Wise, 1996).

Dalším známým povrchovým proteinem je Lmp, který napomáhá shlukování buněk *M. hominis*. Tato schopnost je významná pro kolonizaci sliznic, neboť jednotlivé buňky *M. hominis* jsou snadněji eliminovány z organismu. Ve vhodném prostředí dochází ke shlukování buněk a tím ke skrytí povrchových antigenů před imunitním systémem (Jensen a kol., 1995).

HinT protein se nachází v buňkách eukaryotických i prokaryotických. Zatímco u buněk eukaryotických odpovídá za hydrolýzu adenosinmonofosfátu a ovlivnění transkripce, u buněk prokaryotických není jeho funkce přesně známa. U *M. hominis* je protein HinT složen z proteinů P60 a P80 (Hopfe a kol., 2004).

1.7 Onemocnění vyvolaná *Mycoplasma hominis*

1.7.1 Infekce pohlavních orgánů

M. hominis se spolu s dalšími druhy mikroorganismů podílí na vzniku různých patologických procesů v genitálním ústrojí žen. Často je dáváno do souvislosti s bakteriální vaginózou (Arya a kol., 2001), zánětlivým pánevním onemocněním (Taylor-Robinson a Furr, 1997), ale i bakteriemií (Madoff a Hooper, 1988). Uvedený druh se vyskytuje také v pochvě zdravých žen (Taylor-Robinson a Rosenstein, 2001).

Studiem výskytu tohoto mikroorganismu v pohlavním ústrojí žen se zabývají skupiny vědců po celém světě. Arya a kol. (2001) z Velké Británie uvádějí 21,7% výskyt *M. hominis* v klinickém materiálu žen s různými diagnózami. Podobné údaje publikovali i Belkum a kol. (2001) z Nizozemí, kteří *M. hominis* prokázali ve 24 % vyšetřovaných vzorků. Schlicht a kol. (2004) z USA prokázali *M. hominis* v 15,6 % vzorků. V České republice se výskytem *M. hominis* v genitálním ústrojí žen zabývali Buček a kol. (1989), kteří z 804 vyšetřených žen prokázali sledovaný druh u 238 (29,6 %).

Bakteriální vaginóza (BV) je onemocnění charakterizované vodnatým výtokem a změnou poševní mikroflóry. Tyto projevy jsou následkem snížení nebo úplného vymizení laktobacilů a zvýšení počtu ostatních mikroorganismů, zejména *G. vaginalis* a anaerobních nesporulujících bakterií. Ve většině případů je potvrzen také výskyt *M. hominis* (Priestley a Kinghorn, 1996).

Otázkou, zda se *M. hominis* podílí na vzniku a průběhu BV, se zabývala řada mikrobiologů. Taylor-Robinson a Furr (1997) uvádějí výskyt tohoto druhu v pochvě 10 – 67 % žen s BV. Současně byly v sérech těchto žen zjištěny zvýšené titry IgG protilátek proti *M. hominis*.

Cedillo-Ramírez a kol. (2000) uvádějí 17% výskyt *M. hominis* u žen s BV. U zdravých žen prokázali *M. hominis* pouze ve 2 %. Vyšší výskyt zaznamenali Koch a kol. (1997), kteří vykultivovali *M. hominis* z pohlavních orgánů 37,6 % žen s BV.

Arya a kol. (2001) vyšetřili 1200 poševních výtěrů od žen zdravých a žen s BV. Sledovaný druh prokázali ve 341 vzorcích (28 %). U žen s BV se *M. hominis* vyskytovalo v 59 % a u zdravých žen ve 12 % vzorků. Výsledky studie Aray a kol. (2001) potvrzují vyšší výskyt *M. hominis* u žen s BV užívajících hormonální antikoncepci (36 %) ve srovnání s ženami se zavedeným nitroděložním tělískem (24 %).

V roce 2001 Taylor-Robinson a Rosenstein uvedli, že *M. hominis* není rozhodující pro vznik BV a jeho přítomnost na sliznici poševní nezvyšuje pravděpodobnost rozvoje patologického procesu (Taylor-Robinson a Rosenstein, 2001). Tato zpráva navázala na sdělení Taylora-Robinsona a McCormacka z roku 1980, v němž autoři uvádějí, že k rozvoji BV dochází z důvodu pomnožení různých mikroorganismů, které vytvoří příznivé podmínky pro růst *M. hominis*. Podle Belkuma a kol. (2001) je vyšší vnímavost k infekci *M. hominis* spojena s promiskuitou, která má za následek narušení mikrobiální rovnováhy a vytvoření příhodného prostředí pro *M. hominis* v pochvě.

Výskyt *M. hominis* u pacientek se sexuálně přenosným onemocněním zjišťovali Koch a kol. (1997). Tento mikroorganismus vykultivovali z 6 % vyšetřených žen, nejčastěji ve směsi s *Neisseria (N.) gonorrhoeae*, *Chlamydia (C.) trachomatis* a *Trichomonas (T.) vaginalis*.

Schlicht a kol. (2004) sledovali výskyt *M. hominis* v genitálním ústrojí sexuálně aktivních žen ve věku 18 - 35 let. Vedle *C. trachomatis* a *N. gonorrhoeae* izolovali *M. hominis* z 26 % vyšetřených vzorků. Výskyt *M. hominis* byl u 86 % žen doprovázen poševním výtokem.

Bakteriologická vyšetření abdominální tekutiny od pacientek po hysterektomii prováděli Miranda a kol. (1993). Ze vzorků nejčastěji vykultivovali *Staphylococcus (S.) aureus* a *M. hominis*, často i v čistých kulturách.

Také u mužů je přítomnost *M. hominis* v urogenitálním ústrojí spojována s různými patologickými procesy především záněty nadvarlat, prostaty a močových cest. Stejně jako u žen bývá tento mikroorganismus izolován nejčastěji ve směsi s chlamydiemi a gonokoky.

Význam *M. hominis* při rozvoji těchto onemocnění nebyl doposud zcela objasněn (Taylor-Robinson a McCormack, 1980).

M. hominis bylo izolováno také z rektálních a krčních výtěrů od homosexuálů (Taylor-Robinson, 2003).

1.7.2 Výskyt *Mycoplasma hominis* u těhotných žen

Problematika výskytu *M. hominis* v genitálním ústrojí těhotných žen a vlivu na průběh těhotenství, včetně termínu porodu, je řešena na řadě světových pracovišť. Dosud však nebyla potvrzena jednoznačná souvislost mezi výskytem tohoto mikroorganismu v genitálním ústrojí a předčasným porodem či nízkou porodní váhou novorozence. Rozdílné výsledky sdružují vědce do dvou skupin, z nichž první považuje *M. hominis* za patogen a druhá pouze za mikroorganismus přidružující se k již probíhající infekci.

V roce 1983 se Harrison a kolektiv zabývali sledováním výskytu *M. hominis* na sliznici krčku děložního a jeho vztahem k nízké porodní váze, potratům, porodům mrtvých plodů, předčasným porodům či předčasné ruptuře plodových obalů. Výsledky studie potvrdily pouze souvislost s poporodní horečkou a endometritidou.

Stěry z krčku děložního zdravých těhotných žen vyšetřovali Embil a kol. (1985). *M. hominis* vykultivovali z 36,7 % vzorků, nejčastěji ve směsi s *C. trachomatis*. Cedillo-Ramírez a kol. (2000) izolovali *M. hominis* pouze z 12 % vzorků od těhotných žen a 5 % žen po porodu.

Ve stěrech z cervixu těhotných žen prokázali Chua a kol. (1998) *M. hominis* v 17,7 % vyšetřených vzorků. U novorozenců od těchto matek zjistili sledovaný druh v 5 % případů.

Rosenstein a kol. (1996), kteří sledovali výskyt *M. hominis* ve vztahu k BV zjistili, že tento mikroorganismus se vyskytoval převážně ve stěrech z krčku děložního těhotných žen s probíhající vaginózou. *M. hominis* izolovali z 58 % vyšetřovaných vzorků.

M. hominis ve stěrech z cervixu těhotných žen prokazovali Lamont a kol. (1987). Při hodnocení výsledků rozdělili pacientky do dvou skupin. V první skupině, kterou tvořily ženy s předčasně prasklými plodovými obaly, prokázali *M. hominis* u 23 % pacientek, ve druhé skupině žen bez obtíží ve 25 %. Ženy v první skupině dále hodnotili podle změn na plodových obalech. Pacientky s chorioamnionitidou byly pozitivní na přítomnost *M. hominis* ve 40 %. U žen bez patologických změn bylo *M. hominis* prokázáno pouze ve 13 % stěrů. Výsledky studie nepotvrdily statisticky významné rozdíly vztahu *M. hominis* k předčasnému porušení plodových obalů. Z publikovaných výsledků je však zřejmý třikrát vyšší výskyt *M. hominis* u žen se zánětlivými změnami na plodových obalech.

Termíny porodu a porodní váhu novorozenců u žen s pozitivními a negativními nálezy *M. hominis* sledovali Lamont a kol. (1987). Ani toto hodnocení nepotvrdilo významnou souvislost mezi výskytem *M. hominis* v genitálním ústrojí těhotných žen a termínem porodu, případně porodní váhou novorozence. Průměrná váha novorozenců, kteří se narodili ženám kolonizovaným *M. hominis* byla 1 998 g. Ženy bez nálezu rodily děti s průměrnou hmotností 1 747 g. Délka těhotenství u žen s pozitivním nálezem byla v průměru 226 dní a žen bez *M. hominis* 223 dní.

Vztahem *M. hominis* k předčasným porodům se zabývali Usui a kol. (2002). Autoři prokázali souvislost mezi výskytem mikroorganismu v pohlavních orgánech těhotných žen a vyvoláním porodu před 33. týdnem těhotenství. Vyvolání porodu před 37. týdnem těhotenství však *M. hominis* neovlivňovalo.

Sperling a kol. (1988) vyšetřili 404 vzorků amniové tekutiny stejného počtu žen s probíhající intraamniotickou infekcí. Celkem vykultivovali 123 (30 %) kmenů *M. hominis*. Z celého souboru 404 vyšetřených žen 37 (37,8 %) porodilo dítě s hmotností nižší než 2 500 g. V této skupině bylo *M. hominis* prokázáno ve 14 případech (37,8 %). Celkem 109 (29,7 %) žen pozitivních na *M. hominis* porodilo dítě s váhou nad 2 500 g. V této studii nebyla potvrzena statistická významnost mezi výskytem *M. hominis* v amniové tekutině a nízkou porodní váhou novorozence (Sperling a kol., 1988).

Obdobnou problematikou se zabývali Kataoka a kol. (2006). Autoři vyšetřili 877 vzorků plodových vod od stejného počtu žen a *M. hominis* prokázali v 11,2 %. Ve sledované skupině předčasně porodilo (<34. týden) 21 žen, z nichž pouze 4 (19 %) byly pozitivní na *M. hominis*.

Dva předčasné porody způsobené intrauterinní infekcí *M. hominis* popsali Shimada a kol. (1998). V obou případech vykultivovali z amniové tekutiny *M. hominis*. U jedné z žen se *M. hominis* vyskytovalo spolu s *Enterococcus faecalis*.

Rouse a kol. (2003) prováděli bakteriologická vyšetření placent žen po porodu. Kromě aerobních bakterií (51 %), anaerobních bakterií (35 %), streptokoků se skupinovým antigenem B (15 %), *U. urealyticum* (29 %) vykultivovali také mykoplazmata, a to z 11 % vyšetřovaných vzorků.

Novorozenci mohou být infikováni *M. hominis* od matky také při průchodu porodními cestami. Knausz a kol. (2002) popsali případ meningoencefalitidy novorozence, v jehož mozkomíšním moku prokázali *M. hominis*. Novorozenec se narodil ve 41. týdnu těhotenství, zdravý a vážil 4340 g. Ve stěru z cervixu matky prokázali *M. hominis*.

1.7.3 Extragenitální infekce

Přesto, že je *M. hominis* nejčastěji dáváno do souvislosti s infekcemi urogenitálního systému, stále častěji se objevují zprávy o extragenitálně lokalizovaných infekcích. Ve většině případů tyto infekce postihují pacienty se sníženou funkcí imunitního systému.

Schaeffer a kol. (1997) prokazovali mykoplazmata v synoviální tekutině pacientů s revmatoidní artritidou. Vyšetřili 209 vzorků, z nichž ze dvou vykultivovali *M. hominis*. Jeden z pozitivních pacientů trpěl revmatoidní artritidou, druhý psoriatickou artritidou.

Vztahem *M. hominis* i dalších druhů mykoplazmat (*M. fermentans*, *M. penetrans*, *M. pneumoniae*) k revmatoidní artritidě, fibromyalgii a chronickému únavovému syndromu se zabývali Nicolson a kol. (1999). Autoři zjistili, že kvalitativní i kvantitativní zastoupení mykoplazmat ve vzorcích od pacientů s některým z výše uvedených onemocnění (45-63 %) se prokazatelně liší od asymptomatických pacientů (9 %). U všech pacientů však bylo prokázáno současně více druhů mykoplazmat.

O výskytu mykoplazmat v krvi pacientů s fibromyalgií a chronickým únavovým syndromem informují Nasralla a kol. (1999). Autoři zjistili *M. hominis* v krevních vzorcích 28 (31 %) pacientů z 91 vyšetřených. U většiny pacientů prokázali také další druhy mykoplazmat.

Z krve pacientů s bakteriemií související s operačními výkony v oblasti urogenitálního ústrojí izolovali *M. hominis* Madoff a Hooper (1988). Uvedený druh prokázali také ve vzorcích krve od pacientů s respiračními a kloubními infekcemi a infekcemi centrálního nervového systému (meningitidou, mozgovým abscesem).

Pastural a kol. (2002) popsali infekci způsobenou *M. hominis* u pacienta s transplantovanou ledvinou.

Nálezy *M. hominis* v pochvě žen s lupénkou hodnotili Machado a kol. (2001). U žen s klinickými příznaky onemocnění diagnostikovali *M. hominis* u 20 % a pouze u 2 % zdravých žen v kontrolní skupině. Autoři se domnívají, že *M. hominis* může ovlivňovat průběh tohoto onemocnění.

1.8 Metody průkazu *Mycoplasma hominis*

Průkaz *M. hominis* v klinickém materiálu lze provádět různými metodami. Nejvýznamnější je kultivační vyšetření, dále metody sérologické, mikroskopické a v neposlední řadě dnes velmi propagované metody molekulárně biologické.

1.8.1 Vyšetřovaný materiál

Materiál k průkazu *M. hominis* je odebírán podle charakteru a průběhu infekce většinou před zahájením antibiotické léčby.

U žen jsou to nejčastěji tampónové stěry ze zadní klenby poševní, z krčku děložního a z místa vyústění močové trubice. Dále lze vyšetřovat vzorky amniové tekutiny, abortované plody včetně plodových obalů a moč. Vzorky moče však neposkytují vždy spolehlivé výsledky. U mužů jsou nejvhodnější stěry z vyústění močové trubice, sliznice předkožkového vaku, sperma, případně moč. U extragenitálních infekcí lze vyšetřovat krev, kloubní tekutinu, mozkomíšni mok a bioptický materiál (Taylor-Robinson a McCormack, 1980).

Při podezření na mykoplazmovou infekci novorozenců je vhodné odebírat endotracheální laváž, pleurální tekutinu, krev, mozkomíšni mok, perikardiální tekutinu a hnis z abscesů. Dále je možné vyšetřovat bioptický vzorek tkáně plic (Tully a Razin, 1996).

Pokud nejsou vzorky zpracovány bezprostředně po odběru, je nutné je umístit do transportního média a v co nejkratší době dopravit do laboratoře. Vhodné je uchovávání odebraných vzorků při +7 °C (Buček a kol., 1989).

1.8.2 Mikroskopické vyšetření

Světelná mikroskopie

Velikost buněk *M. hominis* se pohybuje v rozmezí 0,2 - 0,3 μm a proto je nelze pozorovat ve světelném mikroskopu. Toto zařízení je v diagnostice mykoplazmat využíváno k prohlížení kolonií narostlých na agarových médiích.

Nepřímá imunofluorescence

Tato metoda se využívá k průkazu *M. hominis* v preparátech zhotovených ze stěrů z pochvy. Nejprve je vzorek vystaven působení králičí protilátky proti *M. hominis* a následně fluorochromem značeným kozím protilátkám proti králičím imunoglobulinům. Připravený preparát je prohlížen ve fluorescenčním mikroskopu (Hirai a kol., 1991).

Elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie umožňuje pozorovat morfologii mykoplazmatických buněk přímo ve vyšetřovaných vzorcích. Může být použita k vyšetření různého biologického materiálu, tkáňových kultur a vzorků z prostředí. Tato metoda se však běžně nepoužívá pro svou náročnost na vybavení laboratoře, přípravu preparátu a v neposlední řadě i zkušenost

laboratorního pracovníka. Na obr. 2 je znázorněna mykoplazmatická buňka pozorovaná elektronovým mikroskopem ve vzorku mozkomíšního moku (Schramlová, 2004).



Obr. 2 *Mycoplasma* sp. v mozkomíšním moku (Schramlová, 2004)

1.8.3 Kultivační metody

Mykoplazmata mají omezenou biosyntetickou aktivitu, která se odvíjí od jejich malého genomu. Proto jsou nutričně náročná a vyžadují komplexní média obohacená o složky nezbytné pro metabolismus, růst a množení buněk (Taylor-Robinson, 1993).

Kultivační média

První média pro kultivaci mykoplazmat připravil Edward v roce 1974. Tyto půdy jsou dodnes používány pod názvem PPLO agar a PPLO bujón. Jejich základem je infuze z hovězích srdcí, extrakt z kvasnic a koňské sérum. Kvasnicový extrakt je zdrojem vitamínů. Koňské sérum je zdrojem cholesterolu a nasycených a nenasycených mastných kyselin (Taylor-Robinson, 1993).

Toto nutričně bohaté médium je vhodné nejen pro mykoplazmata, ale také jiné bakterie. Proto jsou do půdy určené pro kultivaci mykoplazmat přidávány inhibiční látky potlačující růst nežádoucí mikroflóry. Z antibiotik jsou to penicilin nebo ampicilin. Vzhledem k tomu, že mykoplazmata postrádají buněčnou stěnu, jsou k účinku penicilinových antibiotik přirozeně rezistentní. Působení penicilinů je namířeno především proti gram pozitivním bakteriím. Růst gram negativních bakterií inhibuje octan thallný (Quinn a kol., 2002).

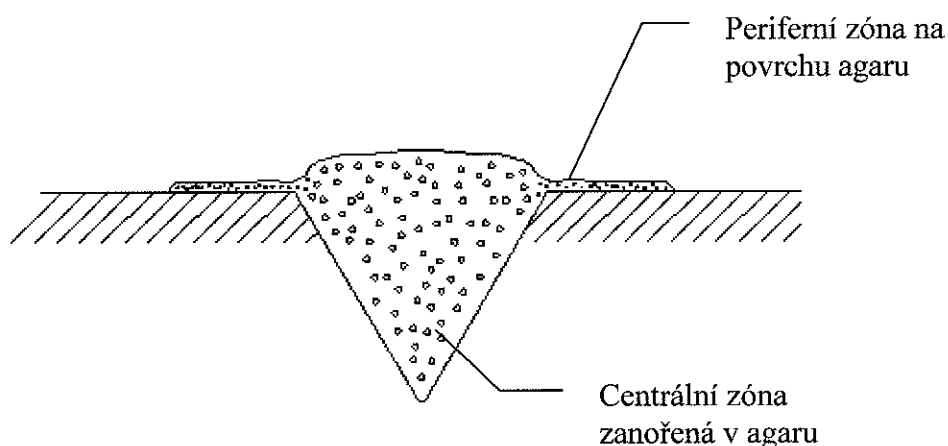
Kultivační média lze dále obohatit o aminokyselinu arginin, kterou *M. hominis* využívá jako zdroj energie (Shimke a kol., 1966). Z dalších růstových faktorů je možné použít DNA (Quinn a kol., 2002). Optimální pH růstového média pro *M. hominis* je 7,0 (Taylor-Robinson, 1993).

Inkubační podmínky

M. hominis je fakultativně anaerobní mikroorganismus. Vhodné prostředí pro jeho růst je atmosféra s obsahem 95 % N₂ a 5 % CO₂ (Taylor-Robinson, 1993). Tekutá média lze inkubovat i v běžných atmosférických podmínkách (Taylor-Robinson a McCormack, 1980). Inkubační teplota se pohybuje v rozmezí 36 – 38 °C a inkubační doba 48 – 96 hodin (Quinn a kol., 2002).

1.8.4 Růst *Mycoplasma hominis* na agarových médiích

M. hominis vytváří na agarových půdách kolonie charakteristického vzhledu připomínajícího sázené vejce (fried egg). Střed kolonie je tmavší a je vnořen do média. Periferní část vyrůstající na povrchu je světlejší (obr. 3). Velikost i tvar kolonií *M. hominis* ovlivňuje složení a hydratace půdy, koncentrace agaru, inkubační podmínky a stáří kultury. Většinou se velikost kolonií pohybuje do 0,5 mm (Quinn a kol., 2002).



Obr. 3 Růst *Mycoplasma hominis* na agarovém médiu (Quinn a kol., 2002)

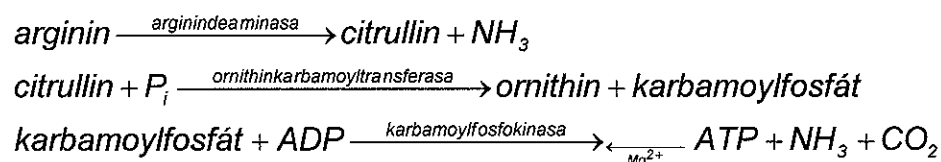
Mykoplazmata vytvářející kolonie malých rozměrů, mohou být zaměněna s tzv. pseudokoloniemi. Tyto artefakty mohou vznikat po více jak týdenní inkubaci na povrchu agarového média následkem vysrážení některých složek obsažených v živné půdě. Pseudokolonie lze odlišit od kolonií mykoplazmat pečlivým porovnáním morfologických znaků a obarvením kolonií Dienesovým barvivem.

Dienesovo barvení

Neobarvené kolonie mykoplazmat jsou slabě nažloutlé nebo nahnědlé a mají granulární vzhled. Po obarvení Dienesovým barvivem nabývají intenzivně modrého zbarvení. Současně s koloniemi mykoplazmat se barví i kolonie bakterií a pseudokolonie, které se však po 30 minutách spontánně odbarví.

1.8.5 Identifikace *Mycoplasma hominis*

Významnou vlastností využívanou v diagnostice *M. hominis* je schopnost využít aminosy arginin až na ATP, NH₃ a CO₂. Výsledkem této metabolické aktivity je zvýšení pH kultivačního média, což se projeví změnou zbarvení acidobazického indikátoru (fenolová červen) z oranžové na růžovou (Schimke a kol., 1966).



1.8.6 Komerční systémy pro diagnostiku *Mycoplasma hominis*

V mikrobiologických laboratořích se k průkazu *M. hominis* a *U. urealyticum* ve vzorcích z urogenitálního ústrojí používají komerčně dodávané sety Mycoplasma IST a Mycoplasma DUO.

Mycoplasma IST (BioMerieux)

Test umožňuje kultivační průkaz druhů *M. hominis* a *U. urealyticum*, jejich semikvantitativní stanovení a zjištění citlivosti na vybraná antibiotika. Princip testu spočívá ve schopnosti uvedených druhů využít specifické substráty, arginin (*M. hominis*) a ureu (*U. urealyticum*). Rozkladem těchto substrátů dochází ke změně pH média a zbarvení acidobazického indikátoru. Výsledky jsou hodnoceny po 48 hodinové inkubaci (Veselská, 2006).

Mycoplasma DUO (Bio-Rad)

Tento test je založen na stejném principu jako test předcházející. Není zde však možnost současně stanovit citlivost kmenů na antibiotika (www.biorad.com, 2007).

1.8.7 Sérologická typizace

Růstově inhibiční test (RIT)

Princip tohoto testu spočívá v inhibici růstu testovaného kmene mykoplazmat na agarovém mediu specifickým antisérem, kterým je napuštěný disk filtračního papíru. Zóna inhibice v okolí disku se odečítá mikroskopicky po 3 - 4 dnech inkubace při 37 °C. Velikosti inhibičních zón se pohybují v rozmezí 0,5 – 1,5 cm.

Tento jednoduchý a specifický test se používá pro druhovou identifikaci mykoplazmat. Jeho spolehlivost je podmíněna použitím hyperimunních sér s vysokým titrem specifických protilátek (Lin a Kass, 1974).

Imunofluorescenční test (IFT)

Touto metodou lze identifikovat kolonie mykoplazmat narostlé na agarových médiích specifickými protilátkami značenými fluorochromem. Po navázání specifického značeného antiséra se kolonie prohlížejí ve fluorescenčním mikroskopu. Barva fluorescence závisí na použitém fluorochromu.

Test je citlivý, specifický, ale vyžaduje kvalitní, fluorochromem značená antiséra s vysokým titrem specifických protilátek (Giudice a kol., 1967).

Test enzymové imunoanalýzy (ELISA)

Mykoplazmový antigen (Ag) reaguje se specifickou protilátkou (Ab) navázanou na povrchu pevné fáze za tvorby imunokomplexu (Ag-Ab). Po inkubaci a promytí je přidána enzymaticky značená protilátka, která se naváže na vazebné místo antigenu v imunokomplexu. Dále je přidán chromogen a substrát. Substrát po enzymatické degradaci změní barvu chromogenu, což je detekováno fotometricky při odpovídající vlnové délce. Metoda je přesná a citlivá (Brown a kol., 1987).

1.8.8 Molekulárně biologické metody

Molekulárně biologické metody jsou v současné době řazeny mezi běžné vyšetřovací postupy v mnoha oborech. Tyto metody, zejména PCR, jsou rutinně využívány pro specifickou detekci bakterií i virů ve vyšetřovaném materiálu a doplňují tak klasické diagnostické postupy.

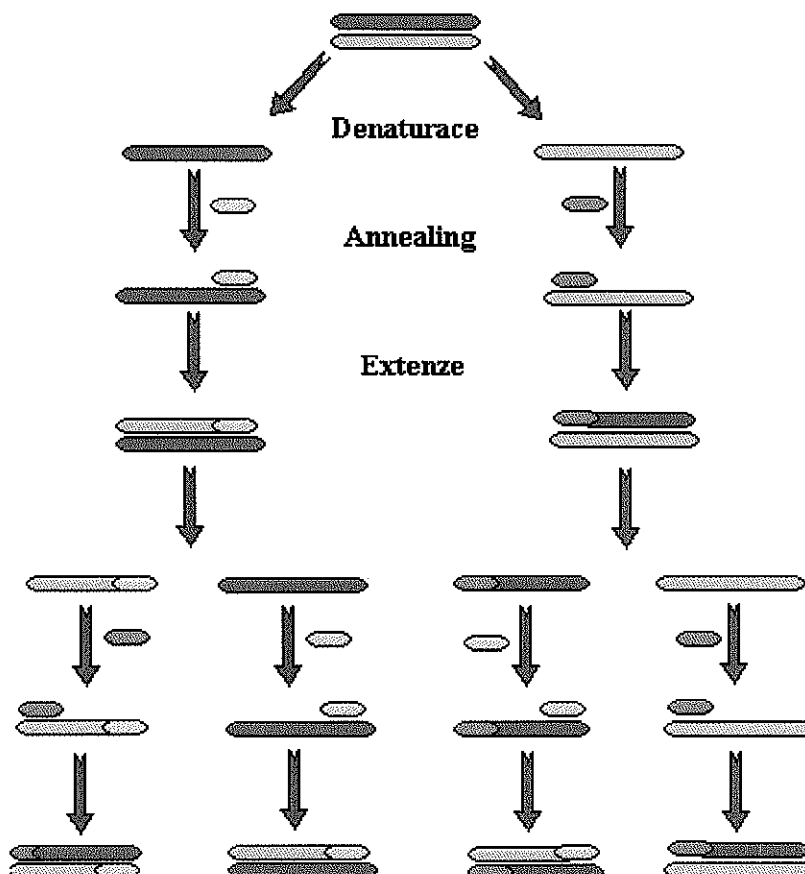
Polymerasová řetězová reakce

Polymerasová řetězová reakce (PCR) byla navržena v roce 1980 Kary B. Mullisem (Mullis a Faloona, 1987; Mullis, 1990). V mikrobiologii je tato metoda využívána k rychlému průkazu a identifikaci infekčního agens. Ve vyšetřovaném vzorku umožňuje specifickou rodovou či druhovou identifikaci mikroorganismů. V diagnostice bakterií je využívána 16S rRNA, která se vyznačuje obsahem vysoce konzervativních oblastí a mezidruhovou rozmanitostí.

Metoda PCR je založena na několika po sobě se opakujících teplotních krocích, během kterých dochází ke zmnožení určitého úseku nukleové kyseliny, který je vybrán a ohraničen primery. Primery jsou synteticky připravené řetězce oligonukleotidů tvořené 17 – 30 nukleotidy (Holland a kol., 1991). Zmnožení zvoleného úseku nukleové kyseliny je umožněno působením polymeračního enzymu Taq DNA polymerasy, který má schopnost vytvářet nové vlákno DNA podle templátu ohraničeného příslušnými primery. PCR zahrnuje tři kroky (obr. 4).

- Prvním je denaturace ($T > 95\text{ °C}$), při které jsou od sebe odděleny obě vlákna DNA na jednotlivé řetězce.
- Druhý teplotní krok tzv. annealing ($T \sim 60\text{ °C}$), v jehož průběhu dochází k nasednutí krátkých úseků DNA (primerů), které ohraničují zvolený úsek detekované DNA.
- Posledním krokem je extenze ($T_{\text{optim}} = 72\text{ °C}$), během níž dochází ke zmnožení zvoleného úseku DNA působením enzymu Taq DNA polymerasy.

Amplifikovaný úsek DNA je detekován v UV světle po předchozí elektroforéze v agarosovém gelu obarveném ethidiumbromidem.



Obr. 4 Princip polymerasové řetězové reakce
<http://members.aol.com/BearFlag45/Biology1A/LectureNotes/lec24.html>

Detekce *Mycoplasma hominis* metodou PCR

Blanchard a kol. (1993) navrhli primery pro konstantní oblast genu 16S rRNA *M. hominis* (tab. 1). Citlivost reakce stanovili mezi 10 a 15 fg DNA *M. hominis*. Specificitu reakce ověřili na 51 kmenech *M. hominis* vykultivovaných z urogenitálního traktu. Kmeny byly získány z různých zemí.

Tab. 1 Nukleotidové sekvence primerů použitých při PCR (Blanchard a kol., 1993)

Označení primerů	Nukleotidová sekvece (5'-3')	Délka amplikonu
RNAH1	CAATGGCTAATGCCGATACGC	334 bp
RNAH2	GGTACCGTCAGTCTGCAAT	

Abele-Horn a kol. (1996) srovnávali výsledky kultivačních průkazů *M. hominis* v urogenitálních vzorcích a vzorcích od novorozenců, s metodou PCR. *M. hominis* prokazovali ve vzorcích po jejich předchozí 24 hodinové inkubaci při 37 °C. K diagnostice použili primery RNAH1 a H2. Detekční limit reakce stanovili 40 fg DNA *M. hominis*. Citlivost PCR metody byla oproti kultivační metodě 95%, zatímco citlivost kultivační metody

oproti PCR pouze 84%. Kultivací neprokázali *M. hominis* v 6 vzorcích, které obsahovaly DNA sledovaného druhu zjištěnou PCR metodou. Naopak metodou PCR se nepodařilo potvrdit dva kultivačně pozitivní vzorky. Autoři se domnívají, že příčinou negativních výsledků PCR byla vysoká koncentrace DNA *M. hominis* ve vzorcích, což mohlo vyvolat inhibici DNA amplifikace.

Srovnáním metody PCR a kultivační metody, určené k identifikaci *M. hominis* v klinickém materiálu, se zabývali Luki a kol. (1998). Vyšetřili stěry z krčku děložního těhotných žen a stěry od novorozenců. Metodu PCR s primery RNAH1 a H2 označili za citlivou a specifickou.

Multiplex PCR

Obměnou tradiční PCR může být přidání více typů primerů do reakční směsi - multiplex PCR. Takto modifikovaná PCR umožňuje analyzovat více parametrů v průběhu jednoho reakčního procesu. Multiplex PCR využili Stellrecht a kol. (2004) k detekci DNA *M. hominis*, *M. genitalium* a *Ureaplasma* spp. ve vzorcích z urogenitálního ústrojí žen i mužů. Zmíněnou metodou prokázali mykoplazmata ve 26 z 30 pozitivních vzorků. Multiplex PCR hodnotí jako rychlou, citlivou a jednoduchou metodu, vhodnou k průkazu mykoplazmat v klinickém materiálu.

Nested PCR

Mezi molekulárně biologické metody využitelné v diagnostice *M. hominis* lze zařadit také metodu Nested PCR, která je rovněž modifikací PCR metody. Využívá dvou po sobě následujících amplifikačních reakcí s dvěma páry primerů. Používá se pro detekci nízké výchozí koncentrace templátu (Mullis at Faloona, 1987).

Polymerasová řetězová reakce v reálném čase

Polymerasovou řetězovou reakci v reálném čase (RT-PCR) zavedli Higuchi a kol. (1992; 1993) v letech 1991 – 1993. Snahou autorů bylo zjednodušit a zvýšit citlivost stanovení produktů PCR. Sestavili proto systém, který umožňoval okamžitou detekci vznikajících produktů PCR.

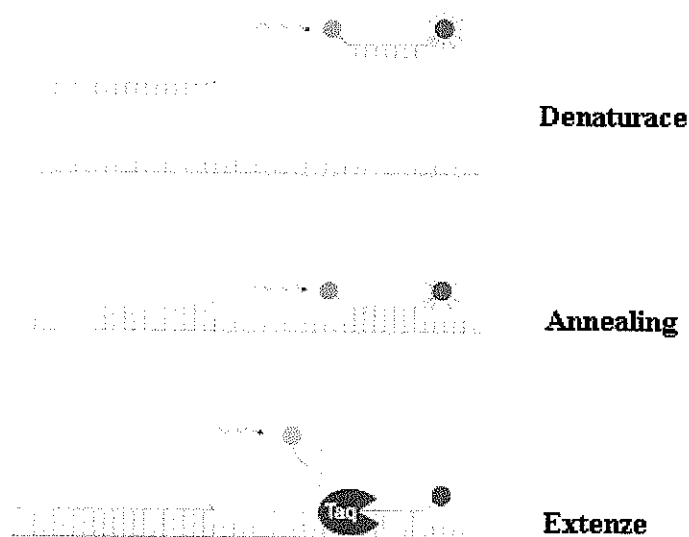
V současnosti je metoda RT-PCR stále více využívána v řadě medicínských oborů, především onkologii a mikrobiologii. Výhodou metody je především možnost kvantitativní detekce nízké koncentrace nukleové kyseliny. V mikrobiologii lze tuto metodu použít k detekci a identifikaci mikroorganismů a monitorování antibiotické rezistence (Valasek a Repa, 2005).

Principem metody RT-PCR je použití specifických sond nebo interkalačního barviva, které umožní detekovat produkty amplifikace bezprostředně po jejich vzniku.

Sondy použitelné v metodě RT-PCR lze rozdělit do dvou skupin, na sondy specifické a nespecifické. Mezi nespecifické sondy řadíme interkalační barviva - SYBR green I a EtBr. Tato barviva mají schopnost vmezeřit se mezi vlákna vznikající DNA. Specifické sondy jsou krátké úseky oligonukleotidů značené vhodným fluorescenčním barvivem. Existují různé druhy sond, z nichž nejznámější jsou TaqMan sondy.

TaqMan sondy byly první fluorescenčně značené sondy použité v metodě RT-PCR. Jsou to krátké oligonukleotidové řetězce značené na 5' konci fluorescenčním barvivem (zářič) a na 3' konci zhášecem. Vzhledem ke krátké vzdálenosti mezi zářičem a zhášecem je záření emitované zářičem potlačeno zhášecem. V průběhu reakce dochází k nasednutí sondy na komplementární vlákno DNA. Následné působení Taq polymerasy, která se vyznačuje silnou 5' - 3' exonukleasovou aktivitou, způsobí rozštěpení nasedlé TaqMan sondy. Tím se od sebe vzdálí zářič a zhášec a dojde k nárůstu fluorescenčního signálu (obr. 5), (Valasek a Repa, 2005).

Postup metody RT-PCR je stejně jako u metody PCR založen na střídání tří teplotních kroků - denaturace ($T > 95\text{ }^{\circ}\text{C}$), annealing ($T \sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) a extenze ($T_{\text{optim}} = 72\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Obr. 5 Princip použití TaqMan sondy (<http://www.pri.wur.nl>)

Detekce *Mycoplasma hominis* metodou RT-PCR

Poprvé metodu RT-PCR v diagnostice *M. hominis* použili v roce 2002 Zariffard a kol. K průkazu použili primery RNAH1 a H2 (Blanchard a kol., 1993) a interkalační barvičku SYBR Green.

Využitím metody RT-PCR v diagnostice *M. hominis* se zabývali také Baczynska a kol. (2004). Autoři se zaměřili na detekci genu kódujícího enzym glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasu. Navrhli pár primerů a dvě fluorescenčně značené sondy. Metodu optimalizovali k detekci 10 kopií genomické DNA referenčního kmene *M. hominis* PG 21.

1.8.9 Nepřímá diagnostika mykoplazmových infekcí

Průkaz specifických protilátek proti mykoplazmatům lze provádět mnoha sérologickými metodami s různou citlivostí a specificitou.

Metabolismus inhibiční test (MIT)

Principem MIT je průkaz protilátek ve vyšetřovaném séru, které inhibují metabolismus mykoplazmat. Ředící řada vyšetřovaného séra v tekutém médiu pro kultivaci mykoplazmat je doplněna substrátem, pH indikátorem a v neposlední řadě kulturou *M. hominis*. Metabolická aktivita se projeví barevnou změnou média. Titr metabolismus-inhibujících protilátek je nejvyšší ředění séra, které ještě inhibuje množení *M. hominis*. Test je citlivý a specifický (Lin a Kass, 1974).

Komplement fixační test (KFT)

Principem komplement fixačního testu je navázání komplementu na komplex Ag-Ab. Indikátorovým systémem jsou v této reakci ovčí erythrocyty senzibilizované králičí protilátkou. Erythrocyty zůstanou neporušeny při vyvázání komplementu komplexem Ag-Ab. Pokud nejsou v séru přítomny specifické protilátky, naváže se komplement na senzibilizované erythrocyty a způsobí jejich lýzu. Tato metoda není příliš citlivá a specifická (Jones a Sequeira, 1966).

Nepřímý hemaglutinační test (NHT)

Test nepřímé hemaglutinace využívá k průkazu protilátek erythrocyty s navázaným antigenem *M. hominis*. V případě přítomnosti specifických protilátek ve vyšetřovaném séru dojde k aglutinaci erythrocytů. Metoda je velmi citlivá, ale pro svou náročnost se téměř nepoužívá (Krogsgaard-Jensen, 1971; Thomsen a Lindskov, 1979).

Test enzymové imunoanalýzy (ELISA)

V tomto testu dochází k navázání prokazovaných protilátek na antigen zakotvený na povrchu jamky mikrotitrační destičky. Vzniklý komplex je prokazován enzymaticky značenými protilátkami po přidání substrátu a chromogenu. Působením enzymu dojde k rozložení substrátu a následné barevné změně chromogenu, která je prokazována fotometricky. ELISA je metoda citlivá a často využívaná (Wang a Lo, 1996).

Test nepřímé imunofluorescence

Test nepřímé imunofluorescence je prováděn na sklíčku s navázaným antigenem *M. hominis*. Po vytvoření komplexu Ag-Ab je na sklíčko nanášena protilátka proti lidským imunoglobulinům značená fluorochromem. Výsledek testu je hodnocen pomocí fluorescenčního mikroskopu. Test je poměrně citlivý a specifický (Furr a Taylor-Robinson, 1984).

1.9 Citlivost *Mycoplasma hominis* na antibiotika

Vhodnými antibiotiky k léčbě mykoplazmových infekcí byly ve 2. polovině minulého století tetracyklin a linkomycin. Za méně účinné byly považovány chloramfenikol, streptomycin a kanamycin. Penicilinová antibiotika byla označena jako neúčinná (Harwick a Fekety, 1969).

Tyto poznatky přetrvávají s určitými výhradami do současnosti. Obecně je známo, že mykoplazmata jsou přirozeně rezistentní k beta-laktamovým antibiotikům. Tato vlastnost je dána strukturou mykoplazmových buněk, které postrádají pevnou buněčnou stěnu - hlavní cíl antibakteriálního účinku penicilinových antibiotik.

Skupinou antibiotik označených za nevhodné k léčbě infekcí způsobených *M. hominis*, jsou také makrolidy. Důvodem je narůstající odolnost na tuto skupinu léčiv. Dosud byly objasněny dva mechanismy rezistence *M. hominis* k makrolidům, a to mutace v genomu vedoucí k rezistenci a aktivní vypuzování antibiotika z buňky, tzv. efflux (Pereyre a kol., 2002). Z makrolidových antibiotik se k léčbě urogenitálních infekcí u těhotných žen používá nejčastěji erytromycin (Taylor-Robinson a Bébéar, 1997). Domingues a kol. (2003) však zaznamenali u 91 % kmenů *M. hominis* rezistenci k erytromycinu. Nižší procento rezistentních kmenů (50 %) uvádějí Kilić a kol. (2004). Výjimkou mezi makrolidovými antibiotiky byl josamycin. V roce 2002 však Pereyre a kol. (2002) izoloval od pacienta josamycin rezistentní kmen *M. hominis*.

Rezistence byla prokázána také u fluorochinolonů považovaných za velmi perspektivní při léčbě mykoplazmových infekcí. Příčinou odolnosti je mutace podjednotky *gyrA*, enzymu DNA-gyrasy nebo získání schopnosti effluxu (Bébéar a kol., 1997). Přes tato zjištění jsou fluorochinolony k léčbě používány, neboť inhibují jak *M. hominis*, tak *U. urealyticum*, a navíc rychle dosahují účinné koncentrace ve tkáních (Kenny a kol., 1989; Hooper a Wolfson, 1985).

Domingues a kol. (2003) neprokázali u žádného z jimi testovaných kmenů *M. hominis* rezistenci k ofloxacinu. Kilic a kol. (2004) však uvádějí 12,5 % kmenů rezistentních k ofloxacinu.

Mechanismem účinku tetracyklinových antibiotik, používaných při mykoplazmových infekcích, je inhibice proteosyntézy v bakteriálních buňkách. V posledních letech se objevují kmeny *M. hominis* rezistentní na tato antibakteriální léčiva. Vznik rezistence spočívá v získání *tetM* genu, který, jak bylo zjištěno, je přenášen mezi bakteriemi v urogenitálním traktu (Roberts a kol., 1985). Výskyt rezistentních kmenů dosahuje již 20 – 30 % (Taraskina a kol., 2002; Domingues a kol., 2003).

Mezi antibiotika používaná, k léčbě mykoplazmových infekcí, patří také linkomycin a klindamycin, které inhibují proteosyntézu (Cummings a McCormack, 1990).

O hodnotách účinných koncentrací antibiotik na *M. hominis* zjištěných různými metodami některými autory informuje tabulka č.2 (str. 34).

Většina antibiotik užívaných k léčbě mykoplazmových infekcí má pouze bakteriostatický účinek, což vysvětluje pomalou eradikaci mykoplazmat z organismu pacienta a časté relapsy (Tully a Razin, 1996; Taylor-Robinson 1999).

Tab. 2 Minimální inhibiční koncentrace inhibující 90 % kmenů *Mycoplasma hominis* publikované různými autory (mg/l)

Antibiotikum	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tetracyklin		32			0,19	2		64	
Doxycyklin	0,12		1	16	0,064		4		
Ciprofloxacin	1		0,5		0,5	2	4	0,5	>1
Ofloxacin	1			0,5			2		
Linkomycin									>1
Klindamycin		0,016						0,064	>1
Erytromycin	>64		≥100	>64		>32	>16		
Josamycin				0,25		0,25			

Legenda:

- 1 – Bébéar a kol., 2000b (použitá metoda – agarová diluční metoda)
- 2 – Duffy a kol., 2000 (použitá metoda – bujónová mikrodiluční metoda)
- 3 – Hannan a kol., 2000 (použitá metoda – bujónová mikrodiluční metoda)
- 4 – Bébéar a kol., 2000a (použitá metoda – agarová diluční metoda)
- 5 – Samra a kol., 2002 (použitá metoda – Etest)
- 6 – Kenny a Cartwright, 2001 (použitá metoda – agarová diluční metoda)
- 7 – Ullmann a kol., 1999 (použitá metoda – agarová diluční metoda)
- 8 – Ngan a kol., 2004 (použitá metoda – Etest)
- 9 – Taylor-Robinson a Bébéar, 1997

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 Materiál a metody

3.1 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 a soukromé gynekologické ordinaci G-MED v Pardubicích. Dále 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.

3.2 Kultivační média

Ke kultivaci i subkultivaci byly používány tekuté a pevné půdy připravené následovně:

PPLO bujón s argininem

2,1 g PPLO Broth without Crystal Violet (Difco) bylo rozpuštěno v 70 ml redestilované vody a sterilizováno 15 minut v autoklávu při 121 °C. Po ochlazení na teplotu 50 - 60 °C byly přidány další složky:

20 ml neinaktivovaného koňského séra

10 ml kvasnicového extraktu

0,8 ml 10% roztoku octanu thalného

0,5 ml ampicilinu (200 mg/l)

0,5 g L-argininu

0,2 ml 1% roztoku fenolové červeně

pH média bylo upraveno 10% roztokem HCl na hodnotu 6,5. Bujónové médium bylo skladováno v lednici při 4 - 5 °C nejdéle 3 týdny.

PPLO agar

3,5 g PPLO Agar (Difco) bylo rozpuštěno v 70 ml redestilované vody a sterilizováno 15 minut v autoklávu při 121 °C. Po ochlazení na teplotu 50 - 60 °C byly přidány další složky:

20 ml neinaktivovaného koňského séra

10 ml kvasnicového extraktu

0,8 ml 10% roztoku octanu thallného

0,5 ml ampicilinu (200 mg/l)

Podle potřeby bylo pH média upraveno 10% roztokem HCl na hodnotu 7.

Takto připravená půda byla rozlévána do umělohmotných Petriho misek o průměru 60 mm do výšky 4 mm a dále skladována v lednici při 4 - 5 °C nejdéle 3 týdny.

Transportní médium

Transportní médium odpovídalo svým složením PPLO bujónu s argininem s tím rozdílem, že neobsahovalo arginin a fenolovou červeň.

Krevní agar

4 g Blood Agar Base No. 2 (Oxoid) byly rozpuštěny ve 100 ml destilované vody a sterilizovány 15 minut v autoklávu při 121 °C. Po ochlazení na teplotu 50 - 60 °C bylo přidáno 5 % defibrinované beraní krve.

Takto připravená půda byla rozlévána do Petriho misek a dále skladována v lednici při 4 - 5 °C nejdéle 3 týdny.

Endův agar

3,6 g Endo Agar Base (Oxoid) bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody do které byly následně přidány 4 ml 10% roztoku basickeho fuchsinu. Půda byla sterilizována 15 minut v autoklávu při 121 °C.

Takto připravená půda byla rozlévána do Petriho misek a dále skladována v lednici při 4 - 5 °C nejdéle 3 týdny.

3.2.1 Složky pro přípravu kultivačních médií

Kvasnicový extrakt

1 kg čerstvých pekařských kvasnic byl důkladně homogenizován v 500 ml horké redestilované vody a následně doplněn do 1 000 ml redestilovanou vodou. Suspenze byla za stálého míchání zahřívána na 80 °C po dobu 45 minut.

Po ochlazení byla směs centrifugována 30 minut při 3 000 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 MVDr. T. Krejčího, Výroba krevních derivátů a kultivačních médií, Dvůr Králové nad Labem. Neinaktivované koňské sérum bylo uchovááno v 80 ml sterilních lahvičkách při -20 °C nejdéle jeden rok.

Roztok octanu thallného (10%)

V 50 ml sterilní redestilované vody bylo rozpuštěno 5 g octanu thallného (Sigma-Aldrich). Roztok byl skladován v chladničce při 4 °C.

Roztok ampicilinu

Do lahvičky ampicilinu (BIOTIKA) o obsahu 1,0 mg účinné látky bylo přidáno 5 ml sterilní redestilované vody. Po důkladném rozpuštění byl roztok skladován při -20 °C.

L-arginin

Navážené množství L-argininu (HIMEDIA) bylo přidáno do PPLO bujónu.

Roztok fenolové červeně - 1%

1 g fenolové červeně (Pliva LACHEMA) byl rozpuštěn ve 25 ml 0,1 mol/l NaOH, v odměrné baňce byl doplněn do objemu 100 ml sterilní redestilovanou vodou a mírně zahříván do úplného rozpuštění. Roztok byl sterilizován v autoklávu 10 min při teplotě 115 °C. Dále byl skladován při laboratorní teplotě.

Mycoplasma selective supplement

K přípravě některých kultivačních médií byl použit lyofilizovaný suplement Mycoplasma Selective Supplement G (OXOID). Lahvička suplementu obsahuje 20 ml koňského séra, 10 ml kvasnicového extraktu, 25 mg octanu thallného a 20 000 jednotek penicilinu. Obsah lahvičky byl rozpuštěn ve 20 ml sterilní redestilované vody a přidán do 80 ml sterilního agarového nebo bujónového základu ochlazeného na 50 °C.

3.2.2 Referenční kmen *Mycoplasma hominis*

Kvalita připravených médií byla ověřována referenčním kmenem *M. hominis* PG 21 získaným ze sbírky mikroorganismů Pasteurova institutu z Francie. DNA izolovaná z tohoto kmene byla použita také při provádění molekulárně-biologických metod.

3.2.3 Dienesovo barvení

Příprava Dienesova barviva

Methylenová modř (Merck)	2,50 g
Azur II (Pliva LACHEMA)	1,25 g
Maltosa (Sigma-Aldrich)	10,00 g
Na ₂ CO ₃ (Pliva LACHEMA)	0,25 g
Destilovaná voda	100 ml

Jednotlivé složky byly rozpuštěny ve 100 ml destilované vody. Připravený roztok byl sterilizován filtrací a skladován při laboratorní teplotě.

3.3 Potřeby pro PCR

Chemikálie a enzymy pro PCR

- Proteinasa K - 20 mg/ml (Sigma-Aldrich)
- Lyzovací pufr B - 100 mmol/l KCl, 20 mmol/l Tris-HCl, 5 mmol/l MgCl₂, Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- Rekombinantní Taq DNA polymerasa - 5 jednotek/μl (TaKaRa)
- Směs nukleotidů dNTP Mixture for PCR - 2,5 mmol/l každého dNTP (TaKaRa)
- 10x PCR pufr - 100 mmol/l Tris-HCl, pH 8,3; 500 mmol/l KCl; 15 mmol/l MgCl₂ (TaKaRa)
- MgCl₂ - 25 mmol/l (TaKaRa)
- Vkládací pufr (Top-Bio)
- Marker molekulových hmotností pUC19/MspI (MBI Fermentas)
- Agarosa pro molekulární biologii (Serva)
- Ethidiumbromid PCR (Top-Bio)
- TBE pufr – Tris, kyselina boritá, EDTA (Sigma-Aldrich)
- Fenol-chloroform-isoamylalkohol (APLICHEM)

Primery

V tabulce 1 (str. 28) jsou uvedeny nukleotidové sekvence primerů RNAH1 a RNAH2 připravené firmou Generi-Biotech, které ohraničují specifickou oblast 16S rRNA genu *M. hominis*.

3.4 Potřeby pro RT-PCR

Chemikálie a enzymy

Thermo Start Taq DNA polymerasa - 5 j/μl (AB gene)

Směs nukleotidů dNTP Mixture for PCR - 2,5 mmol/l každého dNTP (TaKaRa)

10x Thermo-Start PCR Buffer (AB gene)

25 mmol/l MgCl₂ (AB gene)

Souprava GEN ELUTE BACTERIAL GENOMIC DNA KIT (Sigma-Aldrich)

Souprava RECOCHIP (Sigma-Aldrich)

Primery a sonda

V tabulce 3 jsou uvedeny nukleotidové sekvence primerů s označením mhongaprv (*275M3) a mhongapfw (*275M2) dodané firmou Generi-biotech, které byly použity pro RT-PCR. Tyto primery ohraničují specifickou oblast genu kódujícího enzym glyceralddehyd-3-fosfátdehydrogenasu. Dále je v tabulce uvedena sekvence TaqMan sondy s označením BHQ1 – FAM (Generi-Biotech). Sekvence primerů a sondy byly převzaty z publikace Baczynska a kol. (2004).

Tab. 3 Nukleotidové sekvence primerů použitých při RT-PCR (Baczynska a kol., 2004)

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

3.5 Přístroje a pomůcky

Přístroje

Autokláv (BMT-Sterilab), horkovzdušný sterilizátor (BMT-Sterimat), sušárna (Memmert-UNB500), laminární box MSC 12 (Jouan-MS12), mrazicí box (Sanyo-MDF-U3086S), lednice (AEG-S70402KG), termostat s 5 % CO₂ (SalvisLab-BC170), vodní lázeň (Memmert,-WB14), digitální váhy (Kern-ABT), pH metr (Hanna-pH210), světelný mikroskop (Nikon-YS100), plynový kahan, aparatury na výrobu redestilované a destilované vody (Millipore, RO-plus, Q-plus), centrifuga (HETTICH-MIKRO 20), blokový termostat (BioCote-Stuart), PCR Robocycler (Stratagene), generátor napětí (OSP-300), vany na elektroforézu, transluminátor (Vilber Lourmat), Rotor Gene 3000 (Corbett Research).

Pomůcky

Umělohmotné Petriho misky (Ø 60 mm), skleněné Petriho misky, mikropipety, sterilní špičky, silikonové zátky, zkumavky, mikrozukavky, odměrné válce, kádinky, Erlenmayerovy odměrné baňky, pinzety, kopíčka, očkovací klíčky, buničitá vata, mikrotenové sáčky, rukavice, stojánky, transportní box pro přepravu vzorků.

Skleněné pomůcky byly myty a sterilovány postupem používaným ve virologických laboratořích.

4 Pracovní postup

4.1 Vyšetření tampónových stěrů

Tampónové stěry odebrané z krčku děložního byly po odběru umístěny do transportního média a následně v termoboxu při 8 °C dopraveny do laboratoře.

4.1.1 Kultivační vyšetření

Primokultivace

Odběrový tampón byl důkladně vytřepán v transportním médiu a jemným tlakem o stěnu zkumavky zbaven přebytečné tekutiny. Poté byl tamponem inokulován celý povrch PPLO agarového média. Současně bylo 0,2 ml transportního média přeneseno do zkumavky s 1,8 ml PPLO bujónu s argininem. Takto naočkované agarové médium bylo spolu s PPLO bujónem a transportním médiem inkubováno 24 hodin při 37 °C v termostatu v prostředí s 5 % CO₂. Poté byla provedena subkultivace.

Subkultivace

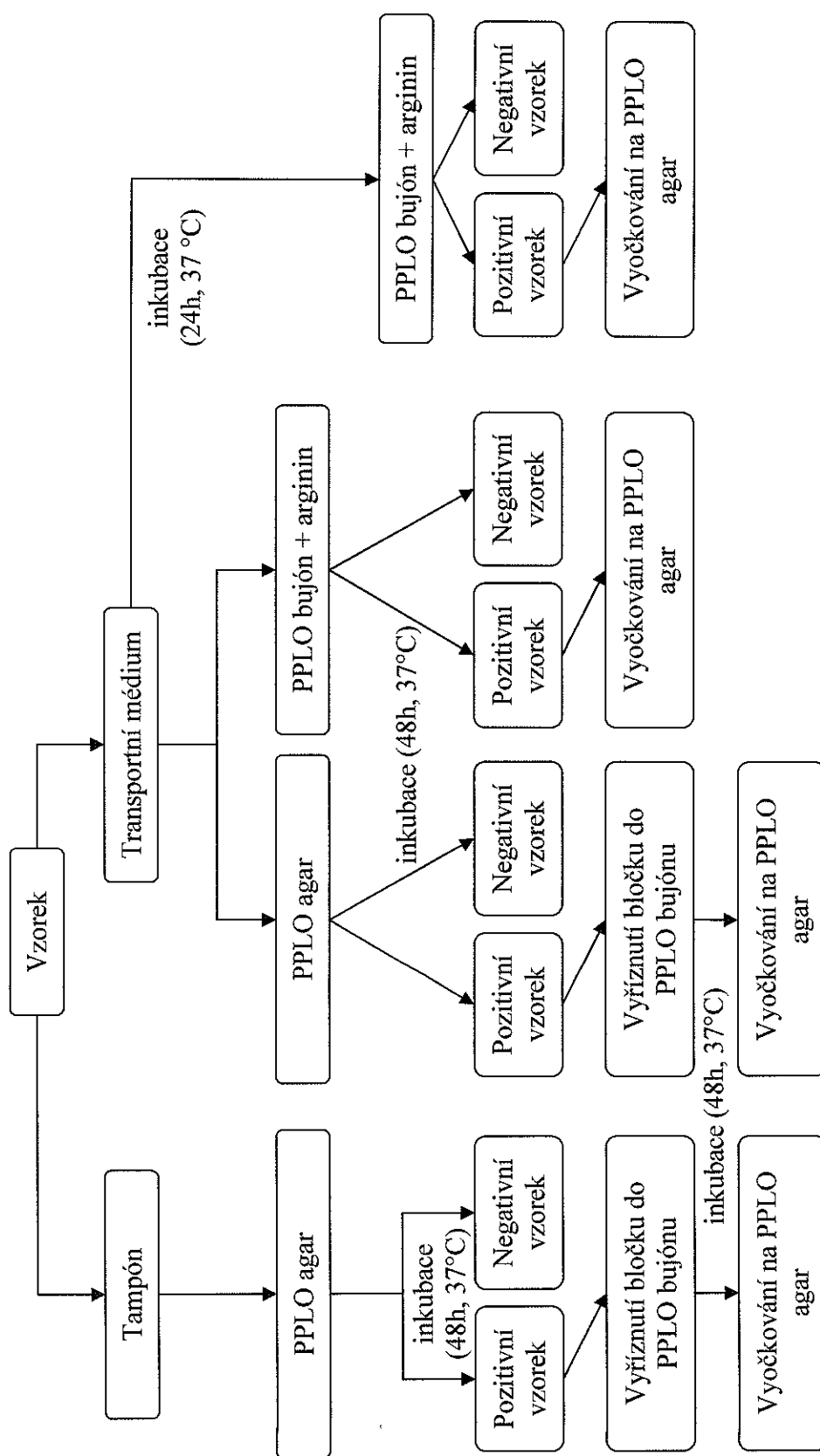
Po 24 hodinové inkubaci bylo opět 0,2 ml transportního média přeneseno do 1,8 ml PPLO bujónu s argininem.

Agarová média byla inkubována 48 hodin. Po skončení této inkubační doby bylo provedeno hodnocení nárůstu kolonií pomocí mikroskopu při zvětšení 120x. Z pozitivních nebo podezřelých agarových médií byl vyříznut sterilním kopíčkem bloček agarů s narostlými koloniemi a následně přenesen do 2 ml PPLO bujónu s argininem. Kopíčkem byl bloček agarů důkladně homogenizován, aby došlo k uvolnění mykoplazmat do tekutého média.

Naočkovaná tekutá média byla inkubována při 37 °C v prostředí s 5 % CO₂. Kontrola těchto selektivně diagnostických pŮd byla prováděna v 8 hodinových intervalech. Byla sledována změna zabarvení acidobazického indikátoru v médiu z oranžové na tmavě růžovou, což je známkou pomnožení *M. hominis* využívající arginin. Tato média byla považována za „pozitivní“ neboli obsahující *M. hominis*. Pro ověření positivity byla média ihned po změně zabarvení vyočkována na PPLO agar. Postup zpracování vzorků znázorňuje obr. 6.

Vzorky vyhodnocené jako pozitivní byly zmrazeny a uchovávány při teplotě -20 °C a -80 °C. Transportní média byla také použita k průkazu a typizaci *M. hominis* metodou PCR.

V případech, kdy po vyočkování pozitivního bujónu na agarovém médiu nenarostly kolonie mykoplazmat, bylo provedeno vyočkování bujónu na krevní a EndŮv agar s cílem zjistit přítomnost kontaminující mikroflóry.



Obr. 6 Schéma postupu vyšetření tamponových stěrů na přítomnost *Mycoplasma hominis* kultivační metodou

Barvení podle Dienes

Vatovým tamponem byl nanesen na čisté podložní sklíčko tenký film Dienesova barviva. Tento film byl stejnoměrný a ne příliš tmavý.

Poté byl vyříznut agarový bloček (1x1 cm) s podezřelými koloniemi a přenesen na další podložní sklíčko koloniemi vzhůru. Na tento agarový bloček bylo umístěno připravené sklíčko barevným filmem dolů. Barvivo postupně difundovalo do agaru po dobu asi 3 minut.

Po nabarvení a odstranění sklíčka byl agarový bloček ponechán 30 minut při laboratorní teplotě. Během této doby došlo k odbarvení kolonií bakterií, zatímco kolonie mykoplazmat zůstaly intenzivně modré (příloha 4). Obarvený agarový bloček byl prohlížen ve světelném mikroskopu při zvětšení 120x.

4.1.2 Polymerasová řetězová reakce

Metodou PCR byla zjišťována přítomnost DNA *M. hominis* v transportních médiích, v nichž byly stěry dopravovány do laboratoře, inkubovaných 24 hodin při 37 °C a poté uchovávaných při -80 °C do vyšetření PCR.

Izolace DNA z transportního média metodou fenol-chloroformové extrakce

Postup byl převzat od Schaefferbeke a kol. (1997).

- Ke 100 µl transportního média bylo přidáno 100 µl lyzovacího pufru B a 3 µl proteinasy K. Následovala inkubace při 37 °C po dobu asi 16 hodin (přes noc).
- K takto připravenému hrubému lyzátu bylo přidáno 250 µl směsi fenol-chloroform-isoamylalkohol v poměru 25:24:1. Směs byla 10 minut důkladně protřepávána na třepačce. Následovala centrifugace 5 minut při 6 000 RPM a dále 2 minuty při 12 000 RPM.
- Do čisté mikrokumavky byla opatrně odsáta horní vodná fáze tak, aby nebyly nasáty proteiny vysrážené na rozhraní obou fází. K odsáté vodné fázi bylo přidáno 250 µl směsi chloroform-isoamylalkohol v poměru 24:1. Směs byla 10 minut třepána na třepačce a dále 10 minut centrifugována při 6 000 RPM. Celý tento izolační krok byl ještě jednou zopakován.

- Do čisté mikroskopické mikrozkušavky byla odsáta horní vodná fáze, ke které bylo přidáno 50 μl 4 mol/l NaCl a dále 500 μl 95% ethanolu. Obsah mikroskopické mikrozkušavky byl opatrným otáčením promíchán a následně centrifugován při 14 000 RPM 15 minut.
- Ethanol byl odsát a stěny mikroskopické mikrozkušavky opláchnuty 70% ethanolom. Promíchaná směs byla centrifugována 15 minut při 14 000 RPM.
- Opatrně byl odsát ethanol. Zbylé množství ethanolu se pomalu odpařovalo z otevřených mikroskopických mikrozkušavek.
- Na závěr byla DNA rozpuštěna ve 40 μl sterilní destilované vody. Izolovaná DNA byla uchovávána při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Primery

K detekci DNA *M. hominis* byly použity primery RNAH1 a RNAH2, jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 1 (str. 28).

PCR směs

Složky reakční směsi byly smíchány podle níže uvedeného postupu.

Voda pro PCR	15,75 μl
10x PCR pufr	2,50 μl
dNTP (2,5 mmol/l)	2,00 μl
MgCl ₂ (25 mmol/l)	2,00 μl
RNAH1 (50 pmol/ μl)	0,25 μl
RNAH2 (50 pmol/ μl)	0,25 μl
Taq polymerasa (5 U/ μl)	0,25 μl
Vzorek DNA	2,00 μl

Stanovení optimální teploty annealingu

Amplifikace testované DNA je závislá na správně zvolené teplotě reakce. Při nízkých teplotách se k sobě mohou nespecificky připojovat vlákna primerů a cílové DNA, která jsou si pouze podobná a nikoli zcela komplementární. Taková reakce by byla zdrojem falešně pozitivních výsledků. Za příliš vysokých teplot annealingu naopak nedochází k navázání ani plně komplementárních primerů a taková reakce pak dává falešně negativní výsledek. Pro každou PCR je tedy nutné teplotu reakce přesně stanovit. Annealingové teploty různých PCR se nejčastěji pohybují v rozmezí 55 - 65 $^{\circ}\text{C}$.

Do reakční směsi připravené podle návodu byla přidána DNA referenčního kmene *M. hominis* PG21. Takto připravené vzorky byly umístěny do jamek gradientového cykléru. Každý vzorek DNA byl množen při různých teplotách annealingu, které se nacházely v rozmezí 57 – 63 °C. Po proběhlé reakci byly produkty reakce vizualizovány na agarosovém gelu s ethidiumbromidem v UV světle.

Stanovení koncentrace Mg^{2+}

Vhodná koncentrace Mg^{2+} je nezbytná pro správný průběh PCR reakce. Při nízké koncentraci Mg^{2+} v reakční směsi mohou primery nasedat na ne zcela komplementární části vlákn. Pokud je koncentrace Mg^{2+} nižší než 0,5 mmol/l může být nasednutí primerů úplně potlačeno nebo se vzniklé komplexy v průběhu extenze rozpadnou.

Reakční směs bez přídavku Mg^{2+} byla připravena podle výše popsaného schématu. Po napipetování do jednotlivých zkumavek bylo ke každému objemu přidáno určité množství $MgCl_2$ do požadované koncentrace 1 – 10 mmol/l. Po proběhlé reakci byly produkty reakce zviditelněny na agarosovém gelu s ethidiumbromidem.

Stanovení detekčního limitu

Cílem stanovení detekčního limitu reakce PCR je zjištění nejnižší koncentrace DNA, kterou lze ještě detekovat. K určení detekčního limitu byl použit vzorek DNA získaný z referenčního kmene *M. hominis* PG21. Izolace tohoto vzorku byla provedena stejným postupem jako při zpracování transportních médií. Absorbance vyizolované DNA byla stanovena spektrofotometricky. Dále byla z naměřené absorbance vypočítána koncentrace DNA podle vzorce uvedeného v publikaci autorů Křemen a kol. (1998). Vzorec vychází z předpokladu, že při $A_{260} = 1$ je koncentrace DNA = 50 $\mu\text{g/ml}$.

$$dsDNA - c = \frac{A_{260}}{0,02} [\mu\text{g/ml}]$$

Kde: dsDNA – dvoušroubovice DNA

c – koncentrace DNA

A – absorbance při vlnové délce 260 nm

Vzorek DNA referenčního kmene *M. hominis* byl použit k vytvoření ředící řady o známé koncentraci DNA v jednotlivých vzorcích. DNA ve vzorcích byla dále detekována metodou PCR.

Elektroforéza amplikonů v 1,5% agarosovém gelu

Příprava gelu

- V 60 ml 1x TBE pufru bylo rozpuštěno 0,9 g agarosy. Směs byla rozvářena 2 minuty v mikrovlnné troubě.
- Do rozvářené agarosy ochlazené na 45 °C byly přidány 4 µl ethidiumbromidu.
- Vzniklý gel byl nalit do formy s vloženým hřebínkem na tvorbu jamek pro vzorky. Po ztuhnutí gelu byl hřebínek vyndán a gel použit k elektroforetickému dělení vzorků.

Nanášení vzorků na gel

- Připravený gel byl umístěn do elektroforetické vany, která byla následně naplněna 1x TBE puftrem.
- Na proužku parafilmu bylo 10 µl vzorku promícháno s 2 µl vkladacího pufru. Takto připravený vzorek byl opatrně napipetován do jamky v gelu.
- Současně s nanášením vzorku bylo do jedné z jamek gelu napipetováno 6 µl markeru molekulových hmotností k přibližnému určení délky dělených amplikonů.

Vizualizace produktů elektroforézy

Elektroforetické dělení probíhalo při 80 V po dobu 50 minut. Po ukončení elektroforézy byly rozdělené amplikony pozorovány pod UV světlem v UV transluminátoru.

4.2 Vyšetření amniové tekutiny

Odběr vzorků

Vzorky amniové tekutiny byly odebírány ženám v období mezi 15. – 22. týdnem těhotenství. Indikace pro odběr amniové tekutiny byly vyšší věk, pozitivní biochemický screening, riziko porodu dítěte s dědičnou chorobou a abnormální výsledky ultrazvukového vyšetření. Od každé pacientky bylo odebráno přibližně 30 ml amniové tekutiny. Počet odebraných vzorků se shodoval s počtem vyšetřených žen.

Vzorky amniové tekutiny v množství přibližně 3 ml byly ve sterilních zkumavkách zaslány do naší laboratoře k průkazu *M. hominis*. Zde byly ihned kultivovány a následně uloženy do mrazicího boxu, kde byly uchovávány při -80 °C pro genetické vyšetření.

4.2.1 Kultivační vyšetření

Primokultivace

Objem 0,2 ml amniové tekutiny byl naočkován do zkumavky s 1,8 ml PPLO bujónu s argininem. Zkumavky byly inkubovány při 37 °C v prostředí 5 % CO₂ 2 – 3 dny. Během inkubace bylo sledováno zbarvení média, jehož změna signalizovala metabolickou aktivitu množícího se *M. hominis*.

Subkultivace

Vzorky PPLO bujónu, v nichž došlo k barevné změně, byly vyočkovány (0,01 ml) na PPLO agar. Petriho misky s agary byly inkubovány v termostatu s mikroaerofilním prostředím (5 % CO₂) při 37 °C minimálně dva dny, kdy bylo provedeno první hodnocení narostlých kolonií. Růst kolonií na PPLO agaru byl hodnocen ve světelném mikroskopu při 120x zvětšení.

4.2.2 RT-PCR

Vzorky amniové tekutiny, uchovávané v mrazícím boxu při -80 °C, byly rozmrazeny a napipetovány po 1 ml do mikrozskumavek. Následně byly centrifugovány při 10 000 RPM po dobu 5 minut. Po skončení centrifugace byla provedena izolace DNA.

Izolace DNA z amniové tekutiny

DNA byla ze vzorků amniové tekutiny izolována komerčně dodávanou soupravou GEN ELUTE BACTERIAL GENOMIC DNA KIT (Sigma-Aldrich) následovně:

- Objem 50 µl sedimentu, získaný po odstředění amniové tekutiny, byl napipetován do nové mikrozskumavky. Odebírán byl sediment, ve kterém se měly nacházet amniocyty s adherovanými mykoplazmaty. Ke vzorku bylo přidáno 150 µl lyzačního roztoku T a 20 µl proteinasy K. Směs byla promíchána a následně inkubována 30 minut při 55 °C v blokovém termostatu.
- Dále bylo přidáno 200 µl lyzačního roztoku C. Směs byla protřepávána po dobu 15 sekund na třepáče a znovu inkubována 10 minut při 55 °C.
- V průběhu inkubace byla provedena aktivace izolačních kolonek 500 µl aktivačního roztoku s následnou centrifugací při 10 000 RPM, 1 minutu.

- Po inkubaci bylo k lyzátu přidáno 200 μ l ethanolu (95 – 100%). Opět následovalo protřepávání 5 – 10 sekund na třepače.
- Celý objem lyzátu (620 μ l) byl přenesen na izolační kolonku a následně centrifugován při 8 500 RPM, 1 minutu. Zkumavka s přefiltrovaným roztokem byla vyměněna za novou.
- Na kolonku bylo nanášeno 500 μ l promývacího roztoku 1. Po centrifugaci při 8 500 RPM, 1 minutu byla opět mikrozukavka vyměněna.
- Na kolonku bylo nanášeno 500 μ l koncentrovaného promývacího roztoku 2. Po centrifugaci při 13 000 RPM, 3 minuty, byla opět vyměněna mikrozukavka.
- Do středu izolační kolonky bylo napipetováno 200 μ l elučního roztoku. Po uplynutí 5 minutové inkubace následovala centrifugace při 8 500 RPM, 1 minutu.
- Izolovaná DNA byla uchovávána při -20 °C.

Příprava standardu pro sestavení kalibrační křivky

Izolace DNA kmene *Mycoplasma hominis* PG21

Kmen *M. hominis* PG21 byl nejprve pomnožen v PPLO bujónu s argininem. DNA byla z kmene vyizolována postupem shodným s izolací DNA z amniové tekutiny a následně zmnožena metodou PCR.

PCR

Úsek kódující enzym glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasu byl namnožen metodou PCR. Složení reakční směsi a postup PCR byl popsán v kapitole 4.1.2. Použité primery jsou uvedeny v tabulce 3 (str. 40).

Izolace amplifikované DNA

Izolace amplifikované DNA byla prováděna v 2% agarosovém gelu s ethidiumbromidem (1 μ g/ml). Do jamky v gelu byl nanášen celý produkt PCR reakce smíchaný s vkládacím pufrem. Současně byl nanášen marker molekulových hmotností pUC19/MspI (0,5 mg DNA/ml). Elektroforéza probíhala v prostředí 1x TBE pufru po dobu 40 minut, při napětí 100 V. Vizualizace byla provedena na transluminátoru při vlnové délce 300 nm. Na gelu byl identifikován fragment o velikosti 144 bp.

Přečištění DNA

Pomocí speciálního hrotu byl naříznut gel u fragmentu DNA ve směru putování produktu. Do vzniklé jamky byl vložen strip RECOCHIP (Takara) navlhčený 1x TBE pufrem. Opět byla zapnuta elektroforéza na 10 minut při 100 V. Během této doby se DNA přesunula do RECOCHIPU. Gel byl znovu umístěn do transluminátoru k ověření, že veškerá DNA se již nachází na RECOCHIPU. RECOCHIP byl vložen do mikrozkušavky s 200 μ l vody a následně centrifugován při 5 000 RPM, 5 s. Veškerá DNA se z RECOCHIPU uvolnila do sterilní destilované vody v mikrozkušavce.

Takto připravená DNA byla zaslána do firmy Generi Biotech s.r.o. v Hradci Králové, za účelem jejího zaklonování do vhodného plazmidu.

Příprava plazmidu

Plazmid se specifickým úsekem DNA *M. hominis* připravila firma Generi Biotech. Jeho koncentrace byla 179 ng/ μ l a velikost 4 100 bp. Čistota plazmidu byla stanovená spektrofotometricky jako poměr A260/A280 = 1,9.

Tento plazmid byl použit ke zhotovení kalibrační křivky. Výchozí koncentrace plazmidu byla přepočítána na počet kopií v jednom mikrolitru, a to podle vztahu (Corbett Research):

$$\frac{(6,02 \cdot 10^{23} [\text{kopie} / \text{mol}]) \cdot \text{koncentrace} [\text{g} / \mu\text{l}]}{MW [\text{g} / \text{mol}]} = \text{Množství} [\text{kopie} / \mu\text{l}]$$

Kde: MW - molekulová hmotnost ($2,71 \cdot 10^6$)

Dosazením do vztahu bylo zjištěno, že výchozí počet kopií je roven $400 \cdot 10^8$ kopií/ μ l.

Kalibrační křivka

Plazmid byl naředěn vodou pro PCR do požadovaných koncentrací $400 \cdot 10^4$ - 4 kopie/ μ l. Tyto koncentrace byly použity pro sestavení kalibrační křivky. Postup a průběh reakce bude vysvětlen v následující kapitole.

Vzorky amniové tekutiny

DNA získaná ze vzorku amniové tekutiny byla přidána do předem připravené reakční směsi.

RT-PCR směs:

Voda pro PCR	8,2 µl
10x Thermo-Start PCR Buffer	2,0 µl
dNTP mix (2,5 mmol/l)	1,6 µl
25 mmol/l MgCl ₂	4,0 µl
mhomgapfw primer (6 µmol/l)	1,0 µl
mhomgaprv primer (18 µmol/l)	1,0 µl
Sonda (6 µmol/l)	1,0 µl
Thermo Start polymerasa (5 j/µl)	0,2 µl
izolovaná DNA	1,0 µl

Zkumavky s touto směsí byly vloženy do přístroje Rotor Gene 3000. Reakce probíhala za těchto podmínek:

Úvodní denaturace	95 °C, 12 minut	} 45 cyklů
Denaturace	95 °C, 55 sekund	
Annealing	55 °C, 55 sekund	
Extenze	72 °C, 30 sekund	

Po proběhlé reakci (trvajících asi 180 minut) jsme získali záznam ve formě křivky.

4.3 Testování citlivosti na antibiotika

U izolovaných kmenů *M. hominis* byla zjišťována citlivost na doxycyklin, erytromycin, linkomycin, ciprofloxacín a ofloxacin firmy Sigma-Aldrich. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byly stanoveny bujónovou diluční metodou ve zkumavkách.

Antibiotika byla rozpuštěna ve sterilní redestilované vodě. Pouze erytromycin byl nejprve rozpuštěn v 95% ethanolu a následně naředěn sterilní redestilovanou vodou. Zásobní roztoky obsahující koncentraci antibiotik 100 000 mg/l byly skladovány při -80 °C nejdéle 1 rok. Požadované koncentrace antibiotik byly připraveny ze zásobního roztoku naředěním PPLO bujónem.

Do zkumavek obsahujících 1,9 ml PPLO bujónu s argininem a příslušnou koncentrací antibiotik bylo inokulováno 0,1 ml bujónové kultury testovaného kmene *M. hominis*. Jako kontrola byl současně očkovan testovaný kmen do média bez antibiotik.

Zkumavky s naočkovanými médii byly inkubovány při 37 °C v prostředí 5 % CO₂. MIC byla poprvé odečtena v okamžiku, kdy bylo zjištěno pomnožení pozitivní kontroly, což se projevilo změnou zabarvení obsahu zkumavky z oranžové na růžovou a následně po 48 hodinách byla správnost prvního hodnocení potvrzena. Hodnota MIC odpovídala první zkumavce, tj. nejnižší koncentraci antibiotika, ve které nedošlo ke změně barvy acidobazického indikátoru následkem utilizace argininu.

4.4 Statistické zpracování dat

Získaná data byla vyhodnocena na Oddělení biostatistiky LF UK v Hradci Králové (RNDr. E. Čermáková) programem NCSS 2004.

Použité metody:

- neparametrický Mann-Whitney test
- Fisherův přesný test
- χ^2 test nezávislosti
- kappa koeficient shody

5 Výsledky

5.1 Růstové vlastnosti *Mycoplasma hominis*

Pro ověření kultivačních půd a inkubačních podmínek byl používán referenční kmen *M. hominis* PG 21. Tento kmen po 2 – 3 denní inkubaci při 37 °C v prostředí s 5 % CO₂ vytvářel na pevné půdě charakteristické kolonie vzhledu sázeného vejce. Růst kmene v tekutém médiu signalizovala změna zabarvení acidobazického indikátoru z oranžové na růžovou následkem utilizace argininu.

Růst *Mycoplasma hominis* na agarových půdách

Růst *M. hominis* na pevných půdách byl hodnocen mikroskopicky při zvětšení 120x. Mykoplazmata vytvářela na agarových půdách charakteristické kolonie vzhledu „sázeného vejce“ s tmavým středem vnořeným do agaru a světlejší okrajovou zónou nacházející se na povrchu. Morfologie kolonií izolovaných kmenů se shodovala s referenčním kmenem.

Kmeny v primokultuře vždy vytvářely kolonie charakteristického tvaru. O růstu mykoplazmat na agarových médiích informuje příloha 1, 2 a 3. Některé kmeny tuto schopnost během opakovaných subkultivací ztrácely. Jejich kolonie byly drobnější, granulované bez zřetelného tmavého středu (příloha 5, 6).

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 červeň, která změnila původně oranžové zabarvení média na tmavě růžové (příloha 7).

Kontaminace

Hodnocení růstu *M. hominis* v tekuté půdě s argininem bylo komplikováno kontaminací vzorků jinými mikroorganismy, které kolonizovaly genitální trakt a stejně jako *M. hominis* utilizovaly arginin. Nejčastěji se vyskytovaly *S. aureus*, *S. epidermidis* a *E. coli*. Tyto mikroorganismy byly prokázány po vyočkování z PPLO bujónu na krevní a Endův agar.

Z dalších mikroorganismů se nejčastěji vyskytovaly kvasinky, které se velmi dobře množily v tekutém i na pevném médiu pro mykoplazmata. Svým rychlým růstem vytvářely kolonie, které překryly pomalu se tvořící kolonie mykoplazmat.

5.2 Stěry z krčku děložního

5.2.1 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 nálezu v době odběru, k věku pacientek a druhu používané antikoncepce.

V tabulce 4 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. 4 Výskyt *Mycoplasma hominis* ve stěrech z krčku děložního žen ve vztahu k anamnéze a klinickému obrazu

Skupina	Anamnéza	Počet vyšetřených vzorků	Pozitivní vzorky	
	Klinický obraz		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 5 (str. 56) 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. 5 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 6. 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. 6 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	

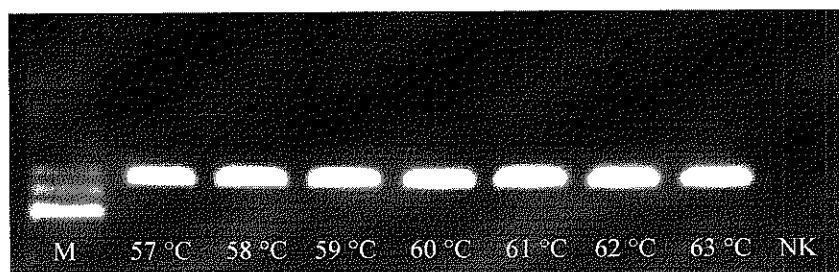
Pro testování rozdílu věku mezi skupinami dle výskytu *M. hominis* byl použit neparametrický Mann-Whitney test. Hladina významnosti testu byla $p = 0,474$. Statisticky významný rozdíl ve věku vyšetřovaných žen dle výskytu *M. hominis* nebyl nalezen.

5.2.2 Polymerasová řetězová reakce

A) Optimalizace metody PCR

Stanovení optimální teploty annealingu

Po proběhlé reakci a následné vizualizaci produktu byla stanovena nejvhodnější teplota annealingu 62 °C. Výsledky amplifikace probíhající při různých teplotách jsou znázorněny na obr. 7.



Obr. 7 Stanovení optimální teploty annealingu PCR pro detekci DNA *Mycoplasma hominis*

Legenda: teploty annealingu 57 – 62 °C

M - marker molekulových hmotností pUC 19

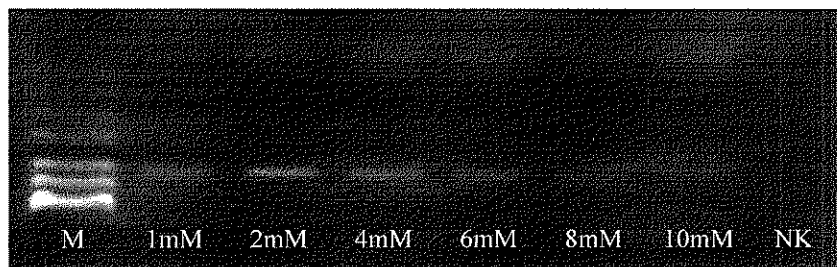
NK - negativní kontrola

Výsledný profil PCR

Úvodní denaturace	95 °C/4 min	} 30 cyklů
Denaturace	94 °C/1 min	
Annealing	62 °C/1 min	
Extenze	72 °C/1 min	
Závěrečná extenze	72 °C/10 min	

Stanovení vhodné koncentrace Mg²⁺

Na obrázku 8 (str. 58) jsou znázorněny výsledky PCR při použití různých koncentrací Mg²⁺. Nejlepší výsledek poskytovala reakční směs obsahující 2 mmol/l MgCl₂.



Obr. 8 Stanovení vhodné koncentrace Mg^{2+} v reakční směsi PCR pro detekci DNA *Mycoplasma hominis* (mM = mmol/l)

Legenda: M – marker molekulových hmotností pUC 19
 1 – 10 mmol/l – koncentrace $MgCl_2$
 NK – negativní kontrola

Stanovení detekčního limitu

Množství vyizolované DNA referenčního kmene *M. hominis* PG21 bylo určeno spektrofotometricky. Z naměřené absorbance byla vypočítána koncentrace vyizolované DNA a její čistota.

Absorbance $A_{260} = 0,028$

$A_{280} = 0,020$

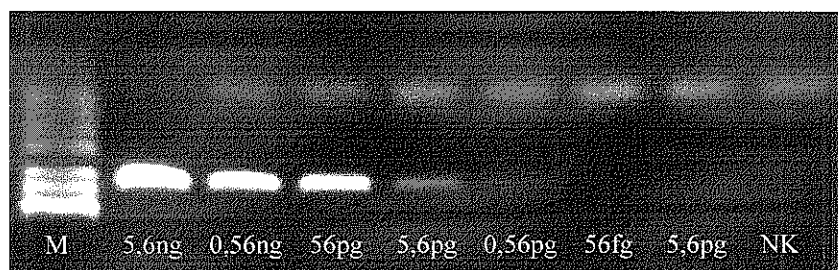
Čistota $= 0,028/0,020 = 1,4$

Koncentrace $= 0,028 \times 4/0,02 = 5,6 \mu\text{g/ml}$

Ze vzorku DNA kmene *M. hominis* PG21 byla připravena ředící řada o známé koncentraci jednotlivých vzorků (tab. 7). Tyto vzorky byly amplifikovány metodou PCR a následně detekovány elektroforeticky v gelu (obr. 9). Zjištěná nejnižší koncentrace DNA, kterou lze metodou PCR s primery RNAH1 a RNAH2 stanovit je 0,56 pg.

Tab. 7 Ředění DNA *Mycoplasma hominis* pro stanovení detekčního limitu metody PCR

Číslo jamky	Koncentrace (g/ μ l)	Množství
1	$5,6 \cdot 10^{-9}$	5,6 ng
2	$5,6 \cdot 10^{-10}$	0,56 ng
3	$5,6 \cdot 10^{-11}$	56 pg
4	$5,6 \cdot 10^{-12}$	5,6 pg
5	$5,6 \cdot 10^{-13}$	0,56 pg
6	$5,6 \cdot 10^{-14}$	56 fg
7	$5,6 \cdot 10^{-15}$	5,6 fg



Obr. 9 Stanovení detekčního limitu PCR pro *Mycoplasma hominis*

Legenda: M – marker molekulových hmotností pUC 19

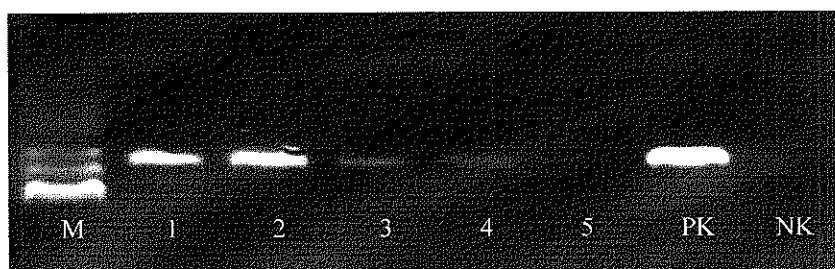
1 – 7 – jamky s různými koncentracemi DNA vzorku, které jsou uvedeny v tabulce 7.

NK – negativní kontrola

B) Výsledky detekce *Mycoplasma hominis* v transportním médiu

Celkem bylo metodou PCR a kultivační 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*. Kultivační 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 kultivačně 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*.



Obr. 10 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

5.3 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.

5.3.1 Kultivační vyšetření

V tabulce 8 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. 8 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 9 (str. 61) 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. 9 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

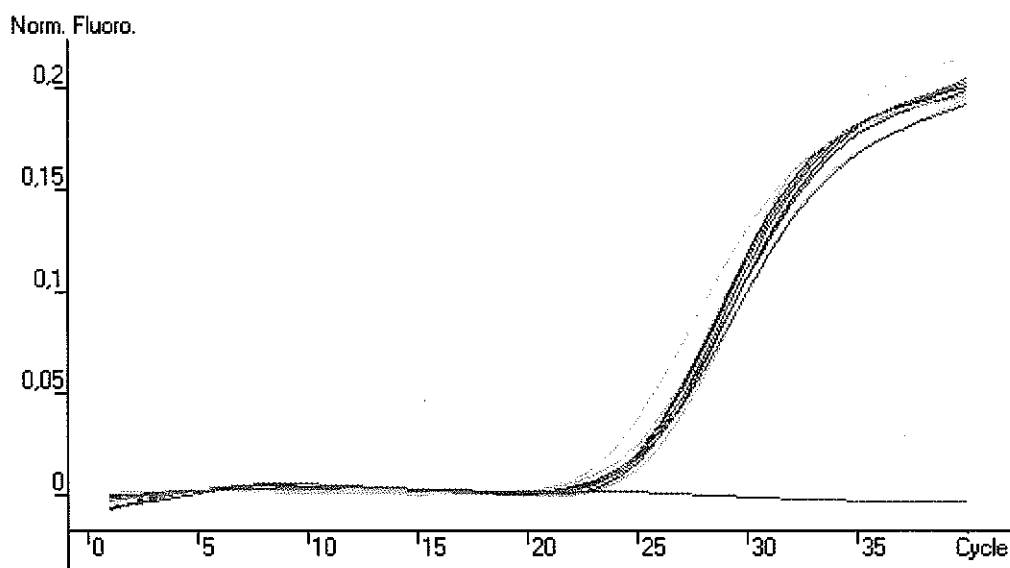
Souvislost mezi kultivačním průkazem *M. hominis* v amniové tekutině a hmotností novorozence byla testována Fischerovým přesným testem. Statisticky významná souvislost mezi kultivační pozitivitou a hmotností novorozence nebyla nalezena. Hladina významnosti testu $p = 0,545$.

5.3.2 RT-PCR

Sekvence primerů a sondy byly převzaty z práce Baczynska a kol. (2004). Z původního navrženého počtu dvou sond byla zvolena pouze jedna, která byla fluorescenčně označena (tab. 3, str. 40).

A) Optimalizace metody RT-PCR

Nejprve byla stanovena koncentrace primerů. Oba typy primerů (mhomgaprv, mhomgapfw) byly naředěny vodou pro PCR do koncentrací – 300 nmol/l, 600 nmol/l a 900 nmol/l. Jednotlivé koncentrace primerů byly použity v různých kombinacích s cílem zjištění nejvhodnější dvojice. Koncentrace sondy použitá při výběru primerů byla 150 nmol/l. Jednotlivé koncentrace dvojic primerů jsou uvedeny v legendě grafu 1, který znázorňuje průběh RT-PCR. Nejvhodnější kombinací primerů byla na základě výsledků zvolena a dále používána koncentrace 300 nmol/l mhomgaprv a 900 nmol/l mhomgapfw.



Graf 1 Znárodnění stanovení koncentrace primerů pro RT-PCR k detekci DNA *Mycoplasma hominis*

Legenda:

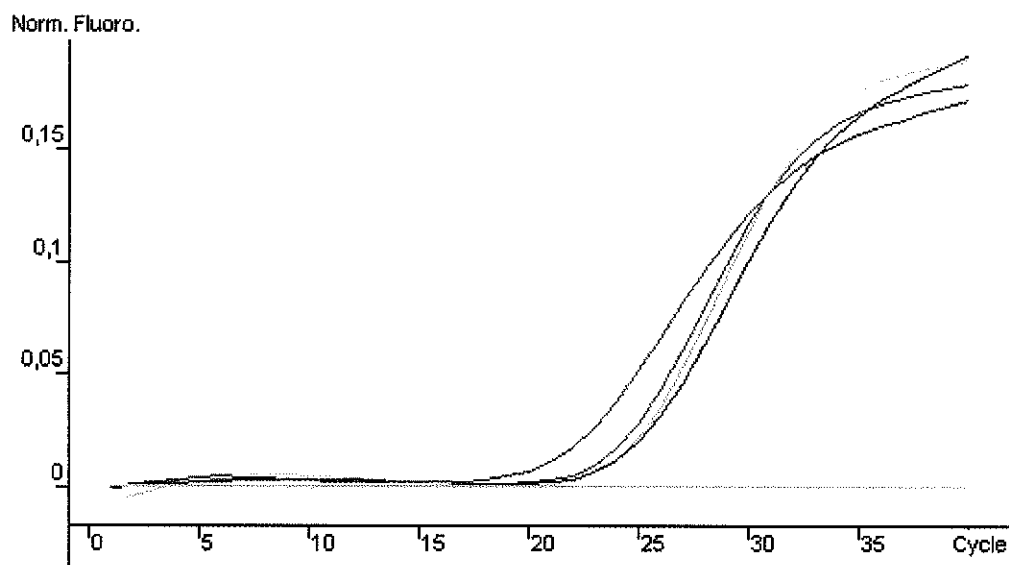
Barva křivky



Koncentrace primerů (nmol/l)	mhomgaprv 300	300	300	600	600	600	900	900	900	NK
	mhomgapfw 300	600	900	300	600	900	300	600	900	






Při výběru nejvhodnější koncentrace sondy byly testovány čtyři koncentrace (150 nmol/l, 200 nmol/l, 250 nmol/l a 300 nmol/l) připravené ze zásobního roztoku naředěním vodou pro PCR do požadované výsledné koncentrace.

Po proběhlé reakci (graf 2) s výše uvedenými koncentracemi primerů byla zvolena koncentrace sondy 300 nmol/l.

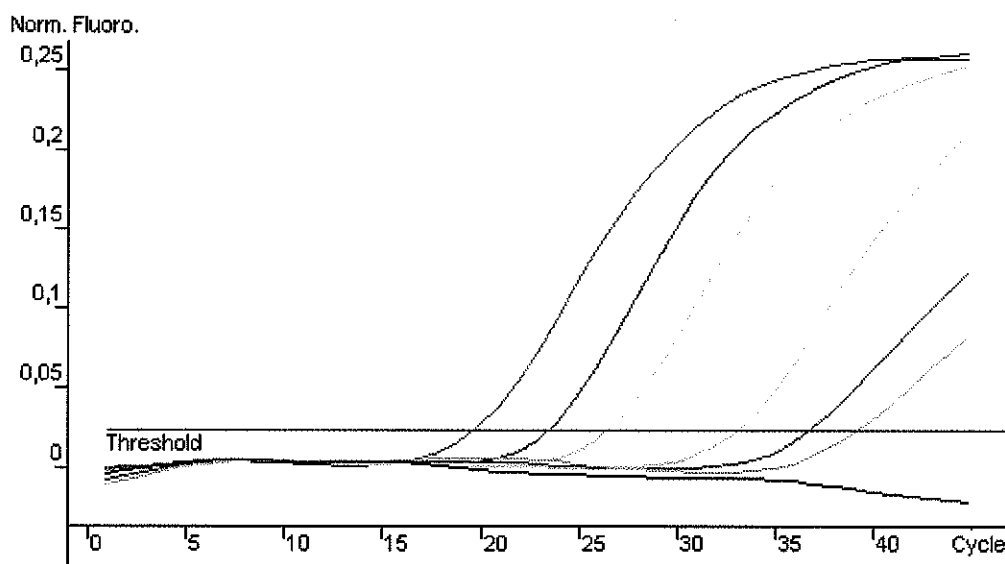


Graf 2 Znárodnění stanovení koncentrace sondy pro RT-PCR k detekci DNA *Mycoplasma hominis*

Legenda:

Barva křivky					
Koncentrace sondy (nmol/l)	150	200	250	300	NK

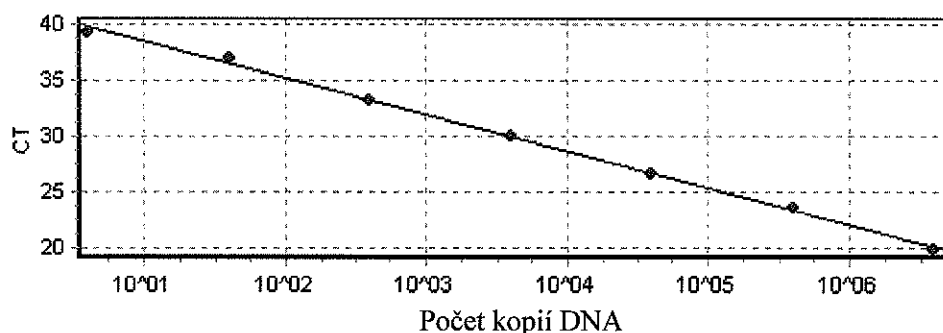
Pro přesné zjištění koncentrace DNA ve vzorcích amniové tekutiny bylo nutné sestavit kalibrační křivku. Za tímto účelem připravila firma Generi Biotech plazmid se specifickým úsekem DNA *M. hominis*. Tento plazmid byl, po předchozím naředění vodou pro PCR, analyzován metodou RT-PCR. Výsledek reakce je znázorněn v grafu 3.



Graf 3 Znárodnění průběhu RT-PCR se vzorky naředěnými na koncentrace požadované pro sestrojení kalibrační křivky

Legenda:

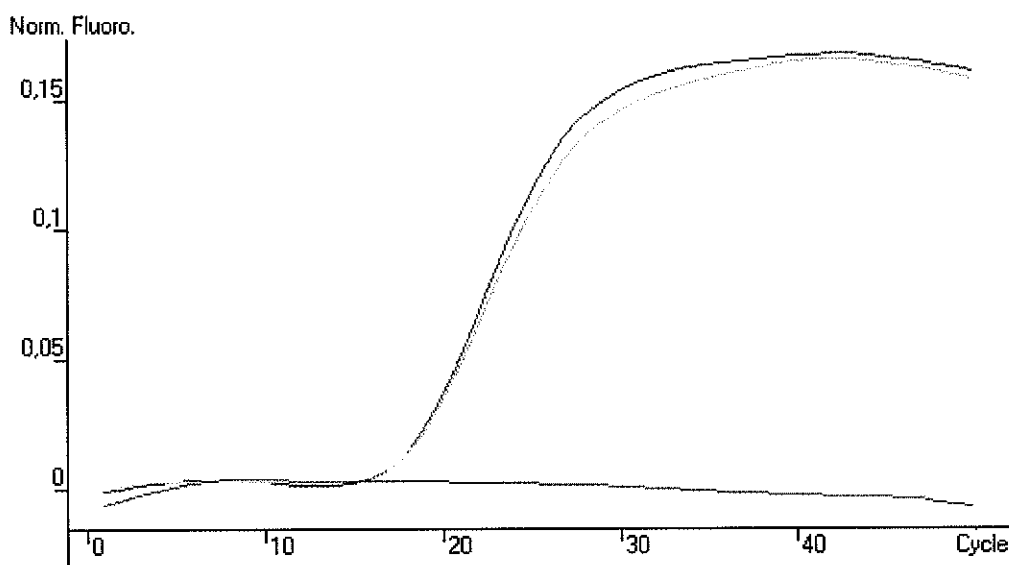
Barva křivky								
Kopii/ μ l	$400 \cdot 10^4$	$400 \cdot 10^3$	$400 \cdot 10^2$	$400 \cdot 10^1$	400	40,0	4,00	NK



Graf 4 Kalibrační křivka - závislost C_t hodnoty na počtu kopií DNA *Mycoplasma hominis* ve vzorcích stanovená metodou RT-PCR

Pozitivní kontrola

Dále byly testovány negativní vzorky amniové tekutiny na přítomnost inhibitorů reakce. K negativnímu vzorku byla přidána pozitivní kontrola. Takto připravený vzorek byl analyzován metodou RT-PCR. Po proběhlé reakci bylo zjišťováno, zdali dochází ke změně průběhu reakční křivky. Graf 5 zobrazuje, že vzorek amniové tekutiny, vyhodnocený jako negativní, neobsahoval inhibitory reakce.



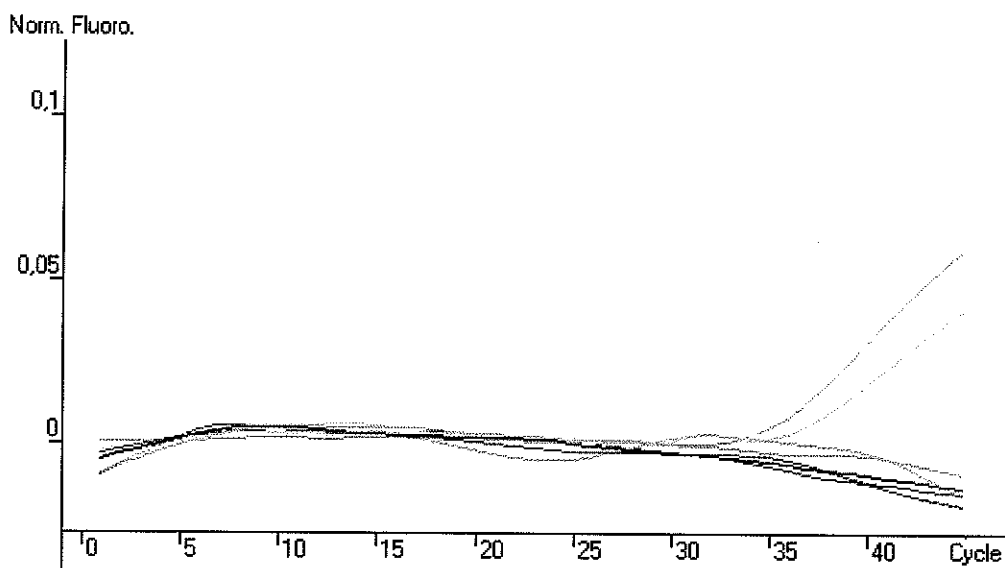
Graf 5 Výsledek stanovení inhibitorů RT-PCR ve vzorcích amniové tekutiny

Legenda:

Barva křivky	■	■	■
Vzorek	Vzorek + Pozitivní kontrola	Pozitivní kontrola	Negativní kontrola









B) 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 6 (str. 66).



Graf 6 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 10. 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. 10 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 11 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. 11 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 $p = 1,000$.

V tabulce 12 jsou zaznamenány výsledky vyšetření těhotných žen s nálezem *M. hominis* a údaje týkající se váhy a zdravotního stavu novorozenců. 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.

Tab. 12 Přehled pacientek s pozitivním nálezem *Mycoplasma hominis* metodou RT-PCR

Pacientka	Délka těhotenství	Váha novorozence	Zdravotní stav	Výsledek kultivace	RT – PCR (kopie/1ml)
1	40	3 420	zdravý	+	10 000
2	42	2 860	zdravý	+	1 000
3	43	3 200	zdravý	+	32 000
4	40	3 830	zdravý	-	2 000
5	40	3 800	zdravý	-	191 000
6	40	2 650	zdravý	-	8 000
7	40	3 750	zdravý	-	28 000
8	40	3 490	zdravý	+	6 000
9	38	3 100	zdravý	-	2 000
10	39	4 150	zdravý	-	15 000
11	41	3 850	zdravý	-	1 000
12	41	3 820	zdravý	-	7 000
13	39	3 040	zdravý	-	109 000

Pacientka	Délka těhotenství	Váha novorozence	Zdravotní stav	Výsledek kultivace	RT – PCR (kopie/1ml)
14	41	3 510	zdravý	+	65 000
15	38	3 680	zdravý	-	13 000
16	37	2 500	zdravý	+	29 000
17	41	4 300	zdravý	-	2 000
18	40	3 700	zdravý	-	3 000
19	40	3 100	zdravý	+	2 000
20	41	3 530	zdravý	+	4 000
21	39	2 960	zdravý	+	3 000
22	40	3 420	zdravý	+	99 000
23	39	3 100	zdravý	+	1 000
24	39	3 370	zdravý	-	3 000
25	40	3 300	zdravý	-	4 000
26	40	3 300	zdravý	+	2 000
27	41	3 700	zdravý	-	1 000
28	40	3 450	zdravý	+	5 000
29	41	2 950	zdravý	-	196 000
30	38	2 900	zdravý	+	4 111 200
31	38	2 460	zdravý	+	22 000
32	40	3 400	zdravý	+	1 763 000
33	40	3 780	zdravý	+	263 000
34	41	3 060	zdravý	-	61 000
35	39	3 570	zdravý	+	969 000
36	40	3 200	zdravý	-	6 000
37	41	4 100	zdravý	+	484 000
38	40	2 860	zdravý	+	42 000
39	42	3 800	zdravý	-	8 000
40	40	3 350	zdravý	+	39 000
41	40	3 300	zdravý	+	3 273 000
42	39	3 870	zdravý	-	11 000
3	39	3 450	zdravý	-	2 000
44	39	1 930	zdravý	-	6 000
45	42	3 640	zdravý	-	7 000
46	41	3 440	zdravý	-	208 000
47	40	3 530	zdravý	-	8 000
48	41	3 360	zdravý	-	81 000
49	39	3 650	zdravý	-	2 000
50	40	3 400	zdravý	+	3 000
51	41	4 050	zdravý	-	1 000

5.4 Citlivost na antibiotika

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

O stanovených účinných koncentracích informuje tabulka 13. Z uvedených údajů vyplývá, že 90 % kmenů *M. hominis* bylo inhibováno doxycyklinem v koncentraci 0,5 mg/l.

Ciprofloxacin, ofloxacin a linkomycin potlačovaly růst 90 % kmenů v koncentrací 2 mg/l. MIC erytromycinu inhibující růst 90 % testovaných kmenů dosahovala hodnoty 1 000 mg/l

Tab. 13 Minimální inhibiční koncentrace *Mycoplasma hominis* stanovena zkumavkovou diluční metodou (vyšetřeno 121 kmenů)

Antibiotikum	MIC (mg/l)		
	Rozmezí koncentrací	50 %	90 %
Doxycyklin	0,06 - 8	0,25	0,5
Ciprofloxacin	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 14 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. 14 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	≥ 8
Doxycyklin	15 (12)	36 (42)	46 (80)	16 (93)	5 (98)	1 (98)	0 (98)	2 (100)
Ciprofloxacin		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

6 Diskuse

Zánětlivá onemocnění pohlavních orgánů žen jsou považována za sexuálně přenosná onemocnění, která se vyskytují častěji než klasické pohlavní nákazy jako kapavka, syfilis, lymfogranuloma 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 kolpitidou. 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 kultivační 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 %, Belkum 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 patientek. 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-Ramírez 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 prekancerózy 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-Ramírezem 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 patientek 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.

Guyen 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 nejvhodnější 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.

Srovnáním 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 usmrčených imunitním systémem již v těle matky. Toto zdůvodnění by mohla podpořit i skutečnost, že téměř všechny vzorky, které byly prokázány pouze metodou RT-PCR měly detekovaný malý počet kopií DNA *M. hominis* v porovnání se vzorky prokázanými 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 studií 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 koncentraci doxycyklinu MIC₉₀ 0,12 mg/l zjistili Bébéar 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. Bébéar 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 a Cartwright (2001). Nižší hodnoty 0,5 a 1 mg/l ofloxacinu zjistili Bébéar 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 Bébéar 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 koncentrací 2 mg/l. Účinností linkomycinu na *M. hominis* se zabývali pouze Taylor-Robinson a Bébéar (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 Bébéar a kol. (2000b) byla MIC₉₀ erytromycinu >64 mg/l. Hannan a kol. (2000) uvádějí MIC₉₀ erytromycinu ≥100 mg/l.

7 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 červeně.

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 červeně. 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 barvivou, 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 (MIC₉₀ 2 mg/l) a linkomycinu (MIC₉₀ 2 mg/l). MIC₉₀ 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. MIC₉₀ 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 podbřišku 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 kultivační 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.

AMIKAM, D. - GLASER, G. - RAZIN, S. *Mycoplasma (Mollicutes)* have a low number of rRNA genes. *Journal of Bacteriology*, April 1984, vol. 158, no. 1, s. 376-378. ISSN: 0021-9193.

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.

BÉBÉAR, C.M., et al. Characterization of *Mycoplasma hominis* mutations involved in resistance to fluoroquinolones. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, February 1997, vol. 41, no. 2, 269-273. 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.

BOESEN, T., et al. Molecular design of *Mycoplasma hominis* Vaa adhesin. *Protein Science*, December 2001, vol. 10, no. 12, s. 2577-2586. ISSN: 0961-8368.

BREDT, W. et al. Microcinematographic studies of *Mycoplasma hominis* cells. *Journal of Bacteriology*, March 1973, vol. 113, no. 3, s. 1223-1227. ISBN: 0021-9193.

BROWN, M.B. et al. Measurement of antibody to *Mycoplasma hominis* by an enzyme-linked immunoassay and detection of class-specific antibody responses in women with postpartum fever. *American journal of obstetrics and gynecology*, March 1987, vol. 156, no. 3, s. 701-708. ISSN: 0002-9378.

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 Microbiologia*, 2000, vol. 42, no. 1, s. 1-6. ISSN: 0187-4640.

CIMOLAI, N. Mycoplasmas. In *Laboratory diagnosis of bacterial infections*. New York: Marcel Dekker, 2001, s. 861-892. ISBN: 0824705890.

CUMMINGS, M.C. – MCCORMACK, W.M. Increase in resistance of *Mycoplasma hominis* to tetracyclines. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, December 1990, vol. 34, no. 12, s. 2297-2299. ISSN: 0066-4804.

DIENES, L. – EDSALL, G. Observations on the L-organism of Klieneberger *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1937, vol 36, 740-744.

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

DUFFY, L.B., et al. Comparative potency of gemifloxacin, new quinolones, macrolides, tetracycline and clindamycin against *Mycoplasma* spp. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, April 2000, vol. 45, no. 1, s. 29-33. ISSN: 0305-7453

EATON, M.D. – MEIKLEJOHN, G. - VAN HERICK, W. Studies on the etiology of primary atypical pneumonia: A filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters and chick embryos. *The Journal of Experimental Medicine*, 1944, vol. 79, no. 1, s. 649. ISSN: 0022-1007.

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.

FREUNDT, E.A. The classification of the pleuropneumonia group of organisms (Borrelomycetales). *International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy*, 1955, vol. 5, s. 67-78. ISSN: 0020-7713.

FURR, P.M. - TAYLOR-ROBINSON, D. Microimmunofluorescence technique for detection of antibody to *Mycoplasma genitalium*. *Journal of clinical pathology*, September 1984, vol. 37, no. 9, s. 1072-1074. ISSN: 0021-9746.

GIUDICE, R.A. – ROBILLARD, N.F. – CARSKI, T.R. Immunofluorescence identification of *Mycoplasma* on agar by use of incident illumination. *Journal of Bacteriology*, April 1967, vol. 93, no. 4, s. 1205-1209. ISSN: 0021-9193.

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.

HARRISON, H.R., et al. Cervical *Chlamydia trachomatis* and Mycoplasmal infections in pregnancy. *The journal of the American Medical Association*, October 1983, vol. 250, no. 13, s. 1721-1727. ISSN: 0098-7484.

HARWICK, H.J. – FEKETY, R.F. The antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis*. *Journal of clinical pathology*, July 1969, vol. 22, no. 4, s. 438-485. ISSN: 0021-9746.

HENRICH, B. – FELDMANN, R.CH. – HADDING, U. Cytoadhesins of *Mycoplasma hominis*. *Infection and Immunity*, July 1993, vol. 61, no. 7, s. 2945-2951. ISBN: 0019-9567.

HIGUCHI, R., et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, September 1993, vol. 11, no. 9, s. 1026–1030. ISSN: 0733-222X.

HIGUCHI, R., et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, April 1992, vol. 10, no. 4, s. 413-417. ISSN: 0733-222X.

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.

HOLLAND, P.M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, August 1991, vol. 88, no. 16, s. 7276-7280. ISBN: 0027-8424.

HOOPER, D.C. – WOLFSON, J.S. The fluoroquinolones: pharmacology, clinical uses, and toxicities in humans. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, November 1985, vol. 28, no. 5, 716-721. ISSN: 0066-4804

HOPFE, M. – HOFFMANN, R. – HENRICH, B. P80, the Hin T interacting membrane protein, is a secreted antigen of *Mycoplasma hominis*. *BMC Microbiology*, December 2004, vol. 4, no. 1, s. 46. ISBN: 1471-2180.

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.

JENSEN, L.T., et al. Selection of *Mycoplasma hominis* PG21 deletion mutants by cultivation in presence of monoclonal antibody 552. *Infection and immunity*, September 1995, vol. 63, no. 9, s. 3336-3347. ISSN: 0019-9567.

JONES, D.M. - SEQUEIRA, P.J. The distribution of complement-fixing antibody and growth-inhibiting antibody to *Mycoplasma hominis*. *The Journal of hygiene*, December 1966, vol. 64, no. 4, 441-449. ISSN: 0022-1724.

KAGAN, G.I., et al. Cultivation of Eaton's agent (*Mycoplasma pneumoniae*) on artificial nutritive media. *Biulleten' eksperimental'noï biologii i meditsiny*, September 1965, vol. 60, no. 9, s. 75-78. ISSN: 0365-9615.

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, Dalbopristin, Dirithromycin, Evernimicin, Gatifloxacin, Linezolid, Moxifloxacin, Quinupristin-Dalbopristin 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.

KENNY, G.E., et al. Susceptibilities of genital mycoplasmas to the newer quinolones as determined by the agar dilution method. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, January 1989, vol. 33, no. 1, s. 103-107. 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.

KNAUSZ, M., et al. Meningo-encephalitis in a neonate caused by maternal *Mycoplasma hominis* treated successfully with chloramphenicol. *Journal of Medical Microbiology*, February 2002, vol. 51, no. 2, s. 187-188. ISSN: 022-2615.

KOCH, A., et al. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients with sexually transmitted diseases. *Wiener klinische Wochenschrift*, 1997, vol. 109, no. 14- 15, s. 584-589. ISSN: 0043-5325.

KROGSGAARD-JENSEN, A. Indirect hemagglutination with mycoplasma antigens: Effects of pH on antigen sensitization of tanned fresh and formalinized sheep erythrocytes. *Applied Microbiology*, November 1971, vol. 22, no. 5, s. 756-759. ISSN: 0003-6919.

LADEFOGED, S.A., et al. A 135-kilodalton surface antigen of *Mycoplasma hominis* PG21 contains multiple directly repeated sequences. *Infection and immunity*, January 1995, vol. 63, no. 1, s. 212-223. ISSN: 0019-9567.

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.

LIN, J. – KASS, E.H. Serological reactions of *Mycoplasma hominis*: Differences among mycoplasmacidal, metabolic inhibition, and growth agglutination tests. *Infection and Immunity*, September 1974, vol. 10, no. 3, s. 535-540. ISSN: 0019-9567.

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.

MADOFF, S. – HOOPER, D.C. Nongenitourinary infections caused by *Mycoplasma hominis* in adults. *Reviews of infectious diseases*, May 1988, vol. 10, no. 3, s. 602-613. ISSN: 0162-0886

MACHADO, A.A., et al. Frequency of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* infections in women with systemic lupus erythematosus. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, May 2001, vol. 34, no. 3, s. 243-247. ISSN: 0037-8682.

MANILOFF, J. The minimal cell genome: „on being the right size“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, September 1996, vol. 93, no. 19, s. 10004-10006. ISBN: 0027-8424.

MIRANDA, C., et al. Posthysterectomy wound infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, July 1993, vol. 17, no. 1, s. 41-44. ISSN: 0732-8893.

MULLIS, K.B. – FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 1987, vol. 155, s. 335-350. ISSN: 0076-6879.

MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific Americana*, April 1990, vol. 262, no. 4, s. 56–61. ISSN: 0036-8733.

NASRALLA, M. – HAIER, J. – NICOLSON, G.L. Multiple Mycoplasmal infections detected in blood of patients with chronic fatigue syndrome and/or fibromyalgia syndrome. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. December 1999, vol. 18, no. 12, 859-865. ISSN: 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.

NICOLSON, G.L., et al. Mycoplasmal infections in chronic illnesses: Fibromyalgia and chronic fatigue syndromes, gulf war illness, HIV-AIDS and rheumatoid arthritis. [online] [cit.2007-6-05]. Dostupné z: <<http://www.haciendapub.com/article24.html>>.

NOCARD, E. – ROUX, E. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1898, vol. 12, s. 240.

NYVOLD, C. – BIRKELUND, S. – CHRISTIANSEN, G. The *Mycoplasma hominis* P120 membrane protein contains a 216 amino acid hypervariable domain that is recognized by the human humoral immune response. *Microbiology*, February 1997, vol. 143, no. 2, s. 675-688. ISSN: 1350-0872.

OLSON, L.D., et al. Monoclonal antibodies to surface antigens of a pathogenic *Mycoplasma hominis* strain. *Infection and immunity*, May 1991, vol. 59, no. 5, s. 1683-1689. ISSN: 0019-9567.

PASTURAL, M., et al. *Mycoplasma hominis* infection in renal transplantation. *Nephrology, dialysis, transplantation*, March 2002, vol. 17, no. 3, s. 495-496. ISSN: 0931-0509.

PEREYRE, S., et al. Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, October 2002, vol. 46, no. 10, 3142-3150. ISSN: 0066-4804.

PETERSON, J.E. – RODWELL, A.W. – RODWELL, E.S. Occurrence and ultrastructure of a variant (rho) form of *Mycoplasma*. *Journal of Bacteriology*, July 1973, vol. 115, no. 1, s. 411-425. ISBN: 0021-9193.

PRIESTLEY, C.J. – KINGHORN, G.R. Bacterial vaginosis. *The British journal of clinical practice*, September 1996, vol. 50, no. 6, s. 331-334. ISSN: 0007-0947.

QUINN, P.J., et al. The Mycoplasmas. In *Veterinary microbiology and microbial diseases*. London: Blackwell Publishing Company, 2002, s. 320-326. ISBN: 0-632-05525-1.

RAZIN, S. – FREUNDT, E.A. The mycoplasmas. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. 740-793.

RAZIN, S. – YOGEV, D. – NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, December 1998, vol. 62, no. 4, s. 1094-1156. ISSN: 1092-2172.

RAZIN, S. Medical microbiology - Mycoplasmas. [online]. [cit. 2005-5-8]. Dostupné z: <<http://gbs.utmb.edu/microbook/ch037.htm>>

RAZIN, S. Mycoplasmas: the smallest pathogenic procaryotes. *Israel journal of medical sciences*, July 1981, vol. 17, no.7, s. 510-515. ISBN: 0021-2180 .

Real-time amplification on the rotor-gene. Corbett Research. Version 1.7. 50 s.

ROBERTS, M.C., et al. Tetracycline-resistant *Mycoplasma hominis* strains contain streptococcal tetM sequences. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, July 1985, vol. 28, no. 1, s. 141-143. ISSN: 0066-4804.

ROSENSTEIN, I.J., et al. Bacterial vaginosis in pregnancy: distribution of bacterial species in different gram-stain categories of the vaginal flora. *Journal of medical microbiology*, August 1996, vol. 45, no. 2, s. 120-126. ISSN: 0022-2615.

ROTTEM, S. In *The mycoplasmas*. New York: Academic press, 1979, s. 259.

ROUSE, D.J., et al. Intrapartum chlorhexidine vaginal irrigation and chorioamnion and placenta microbial colonization. *International journal of gynaecology and obstetrics*, November 2003, vol. 83, no. 2, s. 165-169. ISSN: 0020-7292.

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.

SHIMADA, M., et al. Two patients with premature labour associated with *Mycoplasma hominis* infection. *Journal of medical microbiology*, February 1998, vol. 47, no. 2, s. 179-182. ISSN: 0022-2615.

SCHAEVERBEKE, T., et al. Systematic detection of mycoplasmas by culture and polymerase chain reaction (PCR) procedures in 209 synovial fluid samples. *British journal of rheumatology*, March 1997, vol. 36, no. 3, s. 310-314. ISSN: 0263-7103.

SCHIMKE, T.R., et al. The generation of energy by the arginine dihydrolase pathway in *Mycoplasma hominis* 07. *The Journal of biological chemistry*. May 1966, vol. 241, no. 10, s. 2228-2236. ISSN: 0021-9258.

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.

SCHRAMLOVÁ, J. Výhody a nevýhody diagnostiky metodou elektronové mikroskopie. Zprávy CEM (SZÚ, Praha), 2004, vol. 13, no. 8, s. 348-351. ISSN: 0231-6544.

SPERLING, 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.

STELLRECHT, K.A., et al. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas. *Journal of Clinical Microbiology*, April 2004, vol. 42, no. 4, s. 1528-1533. ISSN: 0095-1137.

SU, C.J. – BASEMAN, J.B. Genome size of *Mycoplasma genitalium*. *Journal of Bacteriology*, August 1990, vol. 172, no. 7, s. 4705-4707. ISSN: 0021-9193.

TARASKINA, A.E. et al. Drift of tetM determinant in urogenital microbiocenosis containing mycoplasmas during treatment with a tetracycline antibiotic. *Bulletin of experimental biology and medicine*, July 2002, vol. 134, no. 1, s. 60-63. ISBN: 0007-4888.

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.

TAYLOR-ROBINSON, D. – FURR, P.M. Genital mycoplasma infections. *Wiener klinische Wochenschrift*, August 1997, vol. 109, no. 14-15, s. 578-583. ISSN: 0043-5325.

TAYLOR-ROBINSON, D. – GILROY, C.B. – KEANE, F.E. Detection of several *Mycoplasma* species at various anatomical sites of homosexual men. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, May 2003, vol. 22, no. 5, s. 291-293. ISSN: 0934-9723.

TAYLOR-ROBINSON, D. – MCCORMACK, W.M. The genital mycoplasmas (first of two parts). *The New England journal of medicine*, May 1980, vol. 302, no. 18, s. 1003-1010. ISSN: 0028-4793.

TAYLOR-ROBINSON, D. – ROSENSTEIN, I.J. Is *Mycoplasma hominis* a vaginal pathogen? *Sexually Transmitted Infections*, August 2001, vol. 77, no. 4, s. 302. ISSN: 1368-4973.

TAYLOR-ROBINSON, D. Mykoplazmata. In *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 1999. Kapitola 42, s. 389-398. ISBN 80-7169-365-0.

TAYLOR-ROBINSON, D. The *Mycoplasmatales*. In *Systematic bacteriology*. Philadelphia, Pennsylvania: B.C. Decker Inc. 1993, s. 664-681. ISBN: 1-55664-290-3.

THOMSEN, A.C. – LINDSKOV, H.O. Diagnosis of *Mycoplasma hominis* pyelonephritis by demonstration of antibodies in urine. *Journal of Clinical Microbiology*, June 1979, vol. 9, no. 6, s. 681-687. ISSN: 0095-1137.

TULLY, J.G. – RAZIN, S. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. San Diego, California: Academic Press, 1996, s. 460–462. ISBN: 0-12-583806-9.

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

USUI, R., et al. Vaginal lactobacilli and preterm birth. *Journal of perinatal medicine*, 2002, vol. 30, no. 6, s. 458-466. ISSN: 0300-5577.

VALASEK, M.A. – REPA J.J. The power of real-time PCR. *Advances in physiology education*, September 2005, vol. 29, no. 3, s. 151-159. ISBN 1043-4046.

VESELSKÁ, A.[online]. [cit.2006-11-16]. Dostupné z:<<http://www.veselska.cz>>

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. ISSN: 0893-8512.

WANG, R.Y. – LO, S. ELISA in human urogenital infections and aids. In *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. San Diego, California: Academic Press, 1996. Kapitola B4, s. 115-121. ISBN: 0-12-583805-0.

ZARIFARD, M.R. et al. Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for Lactobacilli, *Gardnerella vaginalis* and *Mycoplasma hominis*. *FEMS immunology and medical microbiology*, December 2002, vol. 34, no. 4, s. 277-281. ISBN: 0928-8244.

ZHANG, Q. – WISE, K.S. Localized frameshift mutation in an adhesin gene confers a phase-variable adherence phenotype in mycoplasma. *Molecular Microbiology*, September 1997, vol. 25, no. 5, s. 859-869. ISSN: 0950-382X.

ZHANG, Q. – WISE, K.S. Molecular basis of size and antigenic variation of *Mycoplasma hominis* adhesin encoded by divergent vaa genes. *Infection and immunity*, July 1996, vol. 64, no. 7, s. 2737-2744. ISBN: 0019-9567.

Elektronické zdroje

List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclatur [online]. c2007, last revision 9th of August 2007 [cit. 2007-08-18] <<http://www.bacterio.cict.fr./index.html>>.

Plant Research International [online]. c2007, last revision August 2007 [cit. 2007-08-25] <<http://www.pri.wur.nl>>.

Bio-Rad [online]. c2007, last revision August 2007 [cit. 2007-08-25] <www.biorad.com>.

An Electronic Tutorial, Merritt College, Oakland [online]. c2007, last revision November 2001 [cit. 2007-07-15] <<http://members.aol.com/BearFlag45/Biology1A/LectureNotes/lec24.html>>.

Seznam obrázků

Obr. 1 Dělení mykoplazmat (Razin, 1981).....	16
Obr. 2 <i>Mycoplasma</i> sp. v mozkomíšním moku (Schramlová, 2004)	23
Obr. 3 Růst <i>Mycoplasma hominis</i> na agarovém médiu (Quinn a kol., 2002)	24
Obr. 4 Princip polymerasové řetězové reakce (http://members.aol.com/BearFlag45/Biology1A/LectureNotes/lec24.html)	28
Obr. 5 Princip použití TaqMan sondy (http://www.pri.wur.nl).....	30
Obr. 6 Schéma postupu vyšetření tampónových stěrů na přítomnost <i>Mycoplasma hominis</i> kultivační metodou	43
Obr. 7 Stanovení optimální teploty annealingu PCR pro detekci DNA <i>Mycoplasma hominis</i>	57
Obr. 8 Stanovení vhodné koncentrace Mg ²⁺ v reakční směsi PCR pro detekci DNA <i>Mycoplasma hominis</i> (mM = mmol/l).....	58
Obr. 9 Stanovení detekčního limitu PCR pro <i>Mycoplasma hominis</i>	59
Obr. 10 Výsledek stanovení DNA <i>Mycoplasma hominis</i> ve vyšetřovaných vzorcích	59

Seznam tabulek

Tab. 1 Nukleotidové sekvence primerů použitých při PCR (Blanchard a kol., 1993)	28
Tab. 2 Minimální inhibiční koncentrace inhibující 90 % kmenů <i>Mycoplasma hominis</i> publikované různými autory (mg/l)	34
Tab. 3 Nukleotidové sekvence primerů použitých při RT-PCR (Baczynska a kol., 2004)	40
Tab. 4 Výskyt <i>Mycoplasma hominis</i> ve stěrech z krčku děložního žen ve vztahu k anamnéze a klinickému obrazu	54
Tab. 5 Výskyt <i>Mycoplasma hominis</i> ve stěrech z krčku děložního žen ve vztahu k antikoncepci	56
Tab. 6 Výskyt <i>Mycoplasma hominis</i> ve stěrech z krčku děložního žen ve vztahu k věku	56
Tab. 7 Ředění DNA <i>Mycoplasma hominis</i> pro stanovení detekčního limitu metody PCR	58
Tab. 8 Výskyt <i>Mycoplasma hominis</i> v amniové tekutině žen zjištěný kultivační metodou ve vztahu k délce těhotenství (vyšetřeno 202 vzorků)	60
Tab. 9 Výskyt <i>Mycoplasma hominis</i> v amniové tekutině žen zjištěný kultivační metodou ve vztahu k porodní váze novorozence (vyšetřeno 202 vzorků)	61
Tab. 10 Výskyt <i>Mycoplasma hominis</i> v amniové tekutině žen zjištěný metodou RT-PCR ve vztahu k délce těhotenství (vyšetřeno 202 vzorků amniové tekutiny)	66
Tab. 11 Výskyt <i>Mycoplasma hominis</i> v amniové tekutině žen zjištěný metodou RT-PCR ve vztahu k porodní váze novorozence (vyšetřeno 202 vzorků amniové tekutiny)	67
Tab. 12 Přehled pacientek s pozitivním nálezem <i>Mycoplasma hominis</i> metodou RT-PCR	67
Tab. 13 Minimální inhibiční koncentrace <i>Mycoplasma hominis</i> stanovená zkumavkovou diluční metodou (vyšetřeno 121 kmenů)	69
Tab. 14 Počty kmenů <i>Mycoplasma hominis</i> citlivých na jednotlivé koncentrace antibiotik ...	69

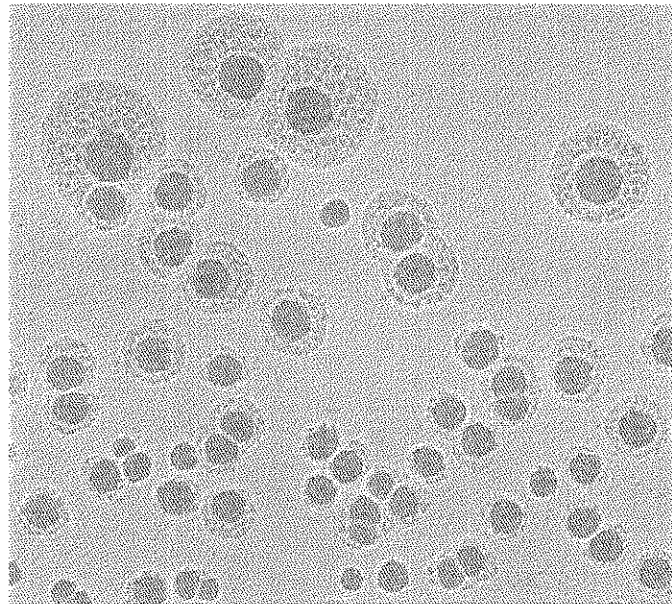
Seznam grafů

Graf 1 Znázornění stanovení koncentrace primerů pro RT-PCR k detekci DNA <i>Mycoplasma hominis</i>	62
Graf 2 Znázornění stanovení koncentrace sondy pro RT-PCR k detekci DNA <i>Mycoplasma hominis</i>	63
Graf 3 Znázornění průběhu RT-PCR se vzorky naředěnými na koncentrace požadované pro sestrojení kalibrační křivky	64
Graf 4 Kalibrační křivka - závislost C_t hodnoty na počtu kopií DNA <i>Mycoplasma hominis</i> ve vzorcích stanovená metodou RT-PCR.....	64
Graf 5 Výsledek stanovení inhibitorů RT-PCR ve vzorcích amniové tekutiny	65
Graf 6 Výsledek detekce DNA <i>Mycoplasma hominis</i> ve vzorcích amniové tekutiny metodou RT-PCR	66

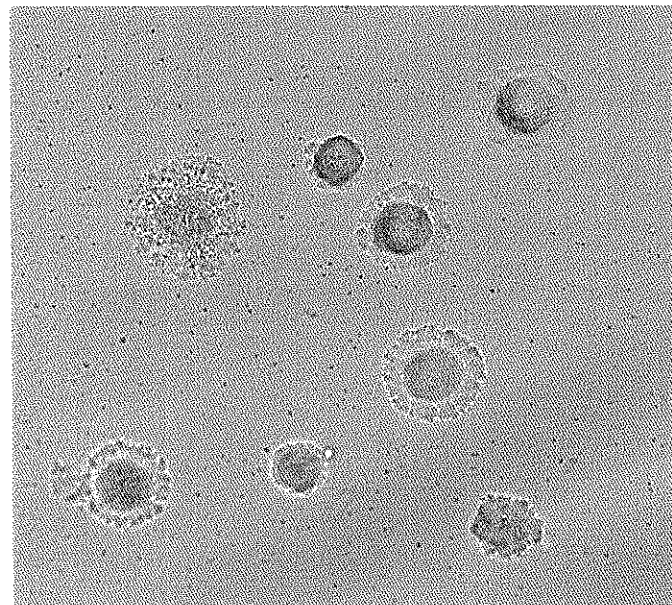
Seznam příloh

- Příloha 1 Charakteristický tvar kolonií *Mycoplasma hominis* na PPLO agaru (150x)
- Příloha 2 Charakteristický tvar kolonií *Mycoplasma hominis* na PPLO agaru (150x)
- Příloha 3 Charakteristický tvar kolonií *Mycoplasma hominis* na PPLO agaru (150x)
- Příloha 4 Charakteristický tvar kolonií *Mycoplasma hominis* na PPLO agaru po obarvení Dienesovým barvivem (150x)
- Příloha 5 Kolonie *Mycoplasma hominis* na PPLO agaru (150x)
- Příloha 6 Kolonie *Mycoplasma hominis* na PPLO agaru (150x)
- Příloha 7 Růst *Mycoplasma hominis* v PPLO bujónu s argininem a fenolovou červení

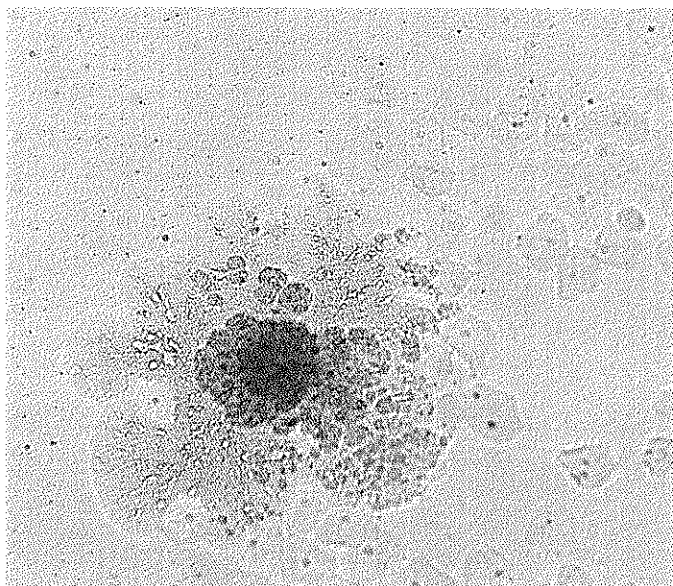
Přílohy



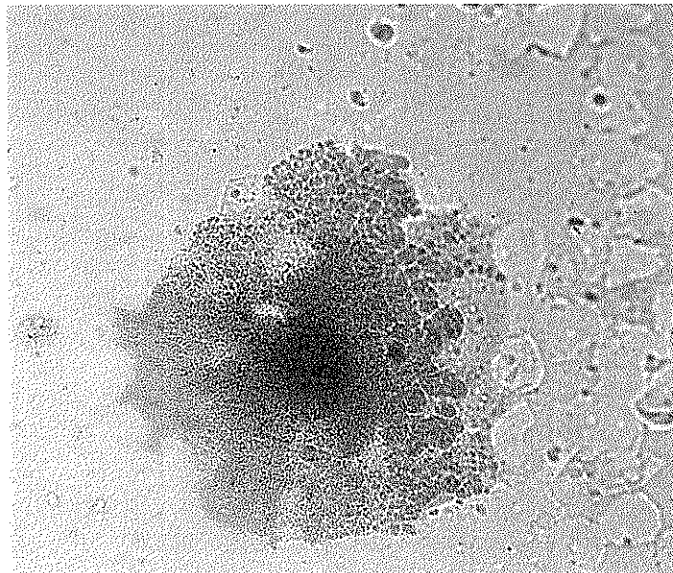
Příloha 1 Charakteristický tvar kolonií *Mycoplasma hominis* na PPLO agaru (150x)



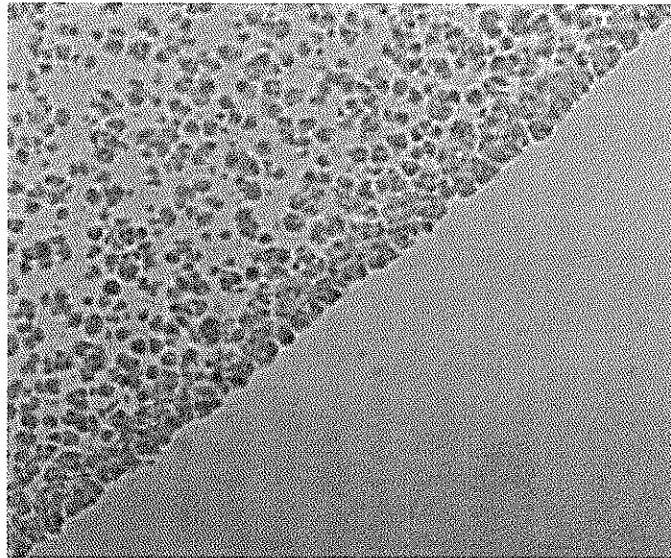
Příloha 2 Charakteristický tvar kolonií *Mycoplasma hominis* na PPLO agaru (150x)



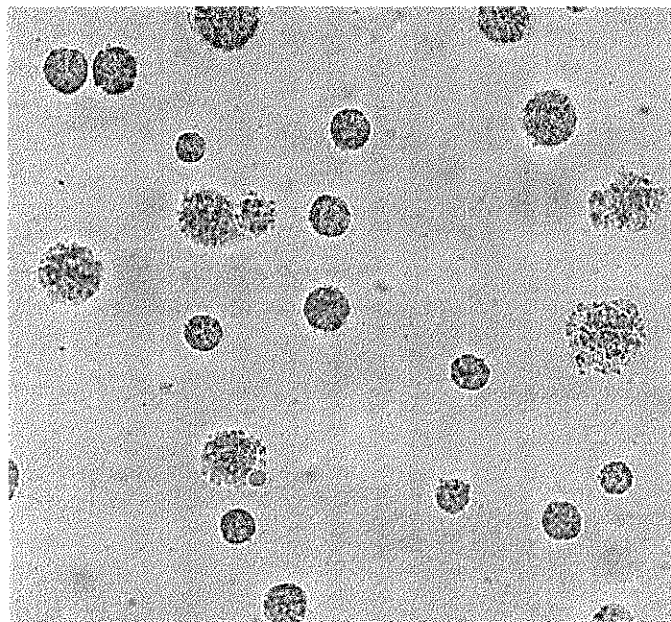
Příloha 3 Charakteristický tvar kolonií *Mycoplasma hominis* na PPLO agaru (150x)



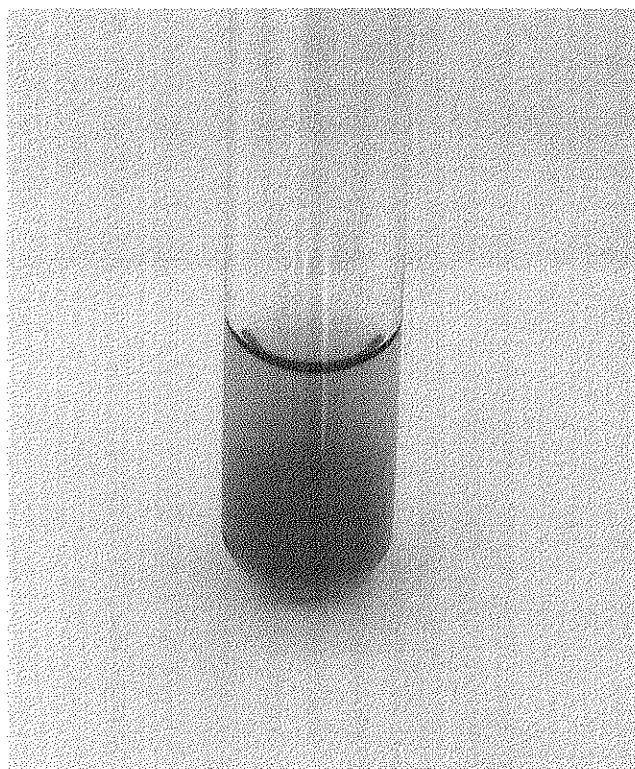
Příloha 4 Charakteristický tvar kolonií *Mycoplasma hominis* na PPLO agaru po obarvení Dienesovým barvivem (150x)



Příloha 5 Kolonie *Mycoplasma hominis* na PPLO agaru (150x)



Příloha 6 Kolonie *Mycoplasma hominis* na PPLO agaru (150x)



Příloha 7 Růst *Mycoplasma hominis* v PPLO bujónu s argininem a fenolovou červení

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. Bacteriology and mycology of otitis externa in dogs. *Journal of veterinary medicine*, 2007, vol. 53, s. 1-5. 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

HRDINOVÁ, 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. – VYDRŽALOVA, 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. Bakteria 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.

HRDINOVÁ, M. – LYSKOVÁ, P. – MAZUROVÁ, 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.

STŘÍTESKÁ, 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.

ÚDAJE PRO KNIHOVNICKOU DATABÁZI

Název práce	<i>Mycoplasma hominis</i> v genitálním ústrojí žen
Autor práce	Mgr. Markéta Vydržalová
Obor	Lékařská mikrobiologie
Rok obhajoby	2008
Vedoucí práce	doc. MUDr. Olga Ryšková, CSc.
Anotace	Disertační práce byla zaměřena na studium diagnostických metod k průkazu <i>Mycoplasma hominis</i> a sledování výskytu uvedeného druhu v pohlavním ústrojí a vzorcích amniové tekutiny žen.
Klíčová slova	<i>Mycoplasma hominis</i> , bakteriální vaginóza, amniová tekutina, kultivace, PCR, Real-time PCR, citlivost na antibiotika