



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Ústav laboratorní diagnostiky a veřejného zdraví

Bakalářská práce

Význam kmenů Mollicutes při urologických infekcích

Vypracovala: Bc. Veronika Šimková
Vedoucí práce: MUDr. Miloš Velemínský, Ph.D.

České Budějovice 2019

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá významem třídy Mollicutes při urologických infekcích. Je zaměřena na diagnostiku urogenitálních mykoplazmat, a to *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*.

Mollicutes tvoří unikátní skupinu mikroorganismů, které představují nejmenší známý organismus schopný samostatného života. Pro člověka mají největší význam rody *Mycoplasma* a *Ureaplasma*. Nejčastěji jsou nacházeny v dutině ústní, v respiračním traktu a urogenitálním traktu. Nejznámější mykoplazma, které způsobují onemocnění urogenitálního traktu, jsou *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*.

Cílem teoretické části práce bylo shromáždění dostupné odborné literatury na toto téma včetně internetových zdrojů, cílem praktické části práce pak ovládnutí laboratorního vyšetření třídy Mollicutes z urologického materiálu na kmeny *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*. Pro naplnění cíle práce jsem také shromáždila výsledky dlouhodobého výzkumného šetření laboratoře z České republiky a ze Slovenské republiky.

V bakalářské práci byly také porovnány laboratorní výsledky z České republiky, Kladna a Bratislavy, které byly získány pomocí různých metod, a to pomocí kultivační soupravy a metody PCR. Výsledky šetření jednoznačně poukázaly na to, že kmen *Ureaplasma urealyticum* se vyskytuje mnohem častěji než kmen *Mycoplasma hominis*. Souhrnné výsledky jsou ve shodě s literárními údaji o výskytu urogenitálních mykoplazmat.

Během zpracování bakalářské práce jsem se naučila technicky zvládat ruční metody práce, včetně izolace DNA mykoplazmat a ureaplazmat.

Výsledky poskytují informace o urogenitálních infekcích, diagnostice, léčbě a prevenci, práce tedy může sloužit jako zdroj informací pro zdravotnické pracovníky, studenty zdravotnických oborů, případně zájemce o tuto problematiku.

Klíčová slova: Mollicutes, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, PCR, urologické infekce, diagnostika, molekulárně biologické metody

Abstract

The bachelor thesis deals with the importance of the Mollicutes class in urological infections. It is focused on the diagnosis of urogenital mycoplasma, namely *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*.

Mollicutes form a unique group of microorganisms that represent the smallest known organism capable of an autonomous life. *Mycoplasma* and *Ureaplasma* are of the greatest importance for humans. They are most commonly found in the oral cavity, in the respiratory tract and in the urogenital tract. The most well-known mycoplasmas that cause urogenital tract disease are *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*.

The aim of the theoretical part of the thesis was to gather available scientific literature on this topic, including Internet resources. The aim of the practical part was to master the laboratory examination of the urological material to Mollicutes class, namely *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* strains. In order to achieve this goal, the results of a long-term research investigation of the laboratory from the Czech Republic and the Slovak Republic were collected.

The bachelor thesis also compared laboratory results from the Czech Republic, Kladno and Bratislava. Results were obtained using two different methods, the culture kit and the PCR method. The results of the investigation showed that the *Ureaplasma urealyticum* strain occurs much more frequently than the *Mycoplasma hominis* strain. Summary results are consistent with the literature on the incidence of urogenital mycoplasma.

During the elaboration of my bachelor thesis, I learned to manually handle the methods of the theoretical part of my thesis, including isolation of DNA mycoplasmas and ureaplasmas.

The results provide information on urogenital infections, their diagnosis, treatment and prevention, thus this work can provide information for healthcare professionals, health care students, or others interested in this theme.

Key words: Mollicutes, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, PCR, urological infections, diagnostics, molecular biological methods

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 26. 4. 2019

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce MUDr. Miloši Velemínskému, Ph.D. a Mgr. Pavlu Trubačovi za odborné posouzení práce, za cenné rady a náměty pro dokončení této práce.

Obsah

Obsah	6
I. TEORETICKÁ VÝCHODISKA.....	8
1 Kmeny Mollicutes.....	8
1.1 Rozdělení Mollicutes	9
1.2 Historie vzniku.....	11
1.3 Klasifikace (Mycoplazma, Ureaplazma)	13
1.4 Fylogeneze a struktura genomu	16
1.5 Morfologie a metabolismus	18
1.6 Patologie Mollicutes	20
1.7 Gynekologické infekce	21
1.8 Urogenitální infekce	24
1.9 Močové infekce.....	25
1.10 Genitální infekce.....	25
1.11 Infekce plodu a novorozence	25
1.12 Příznaky mykoplazmatické infekce	26
1.13 Diagnostika	27
1.14 Léčba.....	28
1.15 Fluorochinolony.....	28
1.16 Tetracykliny	29
1.17 Makrolidy.....	29
1.18 Prevence.....	30
II. VÝZKUMNÁ ČÁST	32
2 Cíle práce a výzkumné otázky	32
2.1 Cíle práce	32
2.2 Výzkumná otázka	32
3 Metodika výzkumu	33
3.1 Vyšetřovaný materiál	33
3.2 Metody použité při vlastní analýze	34
3.2.1 Kultivační metody	34
3.2.2 Metoda polymerázové řetězové reakce	35
3.2.3 Metoda polymerázové řetězové reakce v reálném čase	36
3.2.4 Příprava PCR.....	37
3.3 Metoda ruční izolace DNA	39
3.4 Izolace DNA pomocí izolátoru	42
4 Výsledky výzkumu	44
4.1 Výsledky výzkumu v Nemocnici České Budějovice, a.s.	44
4.2 Výsledky výzkumu v Oblastní nemocnici Kladno, a.s.	46
4.3 Výsledky Centrální laboratoře v Bratislavě – Slovenská republika	48
4.4 Porovnání celkových výsledků	51
5 Diskuze	52
Závěr	55
Seznam použité literatury	57
Internetové odkazy.....	61

Úvod

Mollicutes tvoří unikátní skupinu mikroorganismů. Představují nejmenší známý organismus, který je schopný samostatného života. Pro člověka mají největší význam rody *Mycoplasma* a *Ureaplasma*. Jsou to paraziti lidí i zvířat. Nejčastěji jsou nacházeny v dutině ústní, v respiračním traktu a urogenitálním traktu. Nejznámější mykoplasma, které způsobují onemocnění urogenitálního traktu, jsou *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*, dále také existují *Ureaplasma parvum* a *Mycoplasma genitalium*. *Ureaplasma parvum* a *Mycoplasma genitalium* nebylo možné v historii detekovat, v současné době to možné je pouze metodou PCR, ale kultivačními metodami stále nikoli. Výzkum této práce se zabývá pouze *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*.

Materiál ke klinickému průkazu mykoplazmat se odebírá podle druhu onemocnění, charakteru a průběhu infekce, vždy před léčbou antibiotiky. Odběr se provádí převážně výtěrem z uretry, odebráním moče a ejakulátu. Detekovat mykoplasma je velmi obtížné, kolonie jsou skoro neviditelné, navíc mají mykoplasma velmi vysoké požadavky na růst a jsou velmi snadno přerůstány jinými mikroorganismy. Pro snadnější identifikaci se zavedly metody, jako je například polymerázová řetězová reakce (PCR). Tyto molekulárně biologické metody nám neumožňují jen detekci a identifikaci bakterií, ale také stanovení jejich množství. Jedná se o metody s relativně vysokou spolehlivostí. Jejich výhodou je hlavně krátký čas, který je potřebný na provedení jednoho vyšetření, což v běžné praxi urychlí dobu identifikace.

Cílem bakalářské práce je seznámení se s výskytem třídy Mollicutes při urologických infekcích, seznámení se s metodikou laboratorní diagnózy těchto kmenů a získání konkrétní zkušenosti s pozitivními vzorky na *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*.

I. TEORETICKÁ VÝCHODISKA

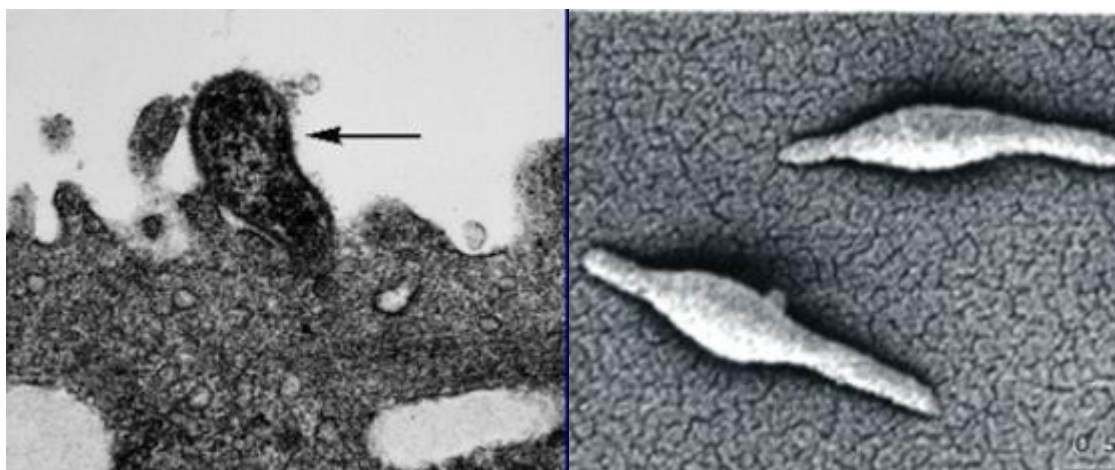
1 Kmeny Mollicutes

Třída Mollicutes byla popsána již v 60. letech. Popisovala mykoplazma a příbuzné organismy a nyní obsahuje 4 řády, 5 rodin, 8 rodů a více než 200 známých druhů, které byly nalezeny u lidí, obratlovců, členovců a rostlin. Je prokázáno, že se vyskytuje nejméně 17 známých druhů, které jsou lokalizovány v respiračním nebo urogenitálním traktu. Některé z těchto druhů jsou komenzální, tzn., že žijí společně s námi, ale tyto tři mykoplazma jsou patogeny. Je to *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium* a *Mycoplasma hominis*. (Ainsworth a kol., 2000) U více než třetiny populace se také vyskytuje *Mycoplasma parvum*, kterou můžeme najít v pohlavním systému. Je jednou z bakterií, která způsobuje ureaplazmatické infekce vedoucí k potížím s plodností a k dalším zdravotním komplikacím. V urogenitálním traktu lze nalézt i *Mycoplasma genitalium*, která způsobuje záněty močové trubice jak u mužů, tak u žen. V této práci se zabýváme pouze *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*.

Mollicutes pochází z latinského mollis (měkký) a cutis (kůže), protože nemá tvrdou buněčnou stěnu. Třída neboli taxonomická skupina Mollicutes získala toto jméno podle své základní vlastnosti (Schindler, 2014). Většina bakterií má kolem sebe pevnou síť vyplněnou peptidy a na povrchu buněčnou stěnu, která je tvořena z peptidoglykanu. Výjimku tvoří právě bakterie třídy Mollicutes. Tyto bakterie nesyntetizují peptidoglykan, a tudíž jim chybí buněčná stěna. Tvoří malé kolonie, od 0,01 – 0,6 mm většinou vzhledu „sázeného vejce“. Jejich tvar tak drží pouze třívrstevná membrána, do které ukládají steroidy. Kvůli této zvláštnosti mají tyto bakterie velkou plasticitu a mohou měnit svůj tvar (Hlaváčová, © 2012).

V čeledi Mycoplazmatacea se nacházejí dva příbuzné rody, a to *Mycoplasma* a *Ureaplasma*. Nejmenší formy měří 100 nm, jejich morfologie (tj. odvětví biologie, které se zabývá tvarem, formou a strukturou organismů), závisí na druhu, na prostředí a na stadiu růstového cyklu. Membrána, kterou je ohraničena buňka, je silná 8-10 nm. (Schindler, 2014)

Podle Bednáře a kol. (1996) patří mykoplazma do zvláštní skupiny bakterií, které se řadí do třídy Mollicutes. Od ostatních bakterií se liší svými specifickými vlastnostmi, které jsou dané zejména tím, že netvoří peptidoglykan (tj. polymer, jehož základem je polysacharid a vyskytuje se pouze ve stěně bakterií. Mollicuta představují nejmenší známý organismus, který je schopný samostatného života a také má v přírodě široké spektrum hostitelů. Například rod *Acholeplazma* se vyskytuje ve vodě a půdě, rod *Spiroplazma* je patogenní pro rostliny a hmyz, nebo rod *Thermoplazma*, jak napovídá jeho název, byl nalezen v extrémně horkém prostředí.



Obr. 1: Buněčná stěna Mollicutes
Zdroj: Morfologie, ©2017

Na obrázku 1 je znázorněna měkká membrána Mollicutes, která je příčinou polymorfie, což znamená, že mají rozmanitý nebo nejednotný vzhled, často mají vzhled koků, kokobacilů a hruštiček až segmentovaných rozvětvených vláken. Buňka je poté ohraničena membránou, která má tloušťku 8-10 nm.

1.1 Rozdělení Mollicutes

Do třídy Mollicutes patří mykoplazma, která jsou nejmenšími prokaryotními organismy, které jsou schopné žít na umělých bezbuněčných půdách. Právě odtud

pochází také název třídy, do které jsou zařazeni – Mollicutes. Pro člověka mají velký význam rody Mycoplazma a Ureaplazma. Rod Mycoplazma má asi 90 druhů a některé druhy jsou součástí normální lidské flóry a jsou nepatogenní, tj. že nevyvolávají žádnou chorobu. Patří sem například druhy Mycoplazma buccale, Mycoplazma orale a Mycoplazma salivarium. Jiné jsou příčinou onemocnění respiračního druhu, např. Mycoplazma pneumoniae. Příkladem mykoplazmat, která způsobují urogenitální infekce, jsou *Mycoplazma hominis*, *Mycoplazma fermentans* a *Mycoplazma genitalium*. Z těchto rodů známe dosud pouze 5 druhů, z nichž lidského původu je druh *Ureaplazma urealyticum*. Názvy mykoplazma a ureaplazma se užívají jako triviální označení kteréhokoli mikroba třídy Mollicutes bez ohledu na to, jestli patří do těchto rodů, či nikoli (Konečná, 2010).

Do třídy Mollicutes se řadí tyto tři velmi důležité mikroorganismy: *Mycoplazma genitalium*, *Mycoplazma hominis* a *Ureaplazma urealyticum*. Jedná se o bakterie, které byly izolované z urogenitálního traktu mužů a žen a jsou potenciálně patogenní. Vyskytují se u sexuálně aktivních jedinců, kde při zvyšujícím se počtu sexuálních partnerů se zvyšuje riziko výskytu těchto patogenů u jedinců. Považují se za extracelulární parazitické organismy (vyskytují se mimo buňku). Pevně adherují (přilnou) na povrch hostitelské buňky urogenitálního epitelu. Podle Vilimovské (2016) existují i studie, které popisují, že tyto mikroorganismy mají schopnost proniknout do buňky, nicméně mechanismus není přesně znám, ale předpokládá se, že se jedná o podobný mechanismus jako má *Chlamydia trachomatis*. Tato Mollicuta mají zajímavou stavbu buňky, nevytváří si peptidoglykan a buněčnou stěnu, a právě proto jsou přirozeně rezistentní na beta-laktamová a ostatní antibiotika, která jsou cílená na buněčnou stěnu. Jedná se především o penicilinovou řadu a cefalosporiny. Jejich dalším společným znakem je, že v současné době u nich není popsán patogenní potenciál a dopad těchto mikroorganismů na lidské zdraví (Vilimovská, 2016).

Podle Gdoura a kol. (2007) tvoří mykoplazma a ureaplazma unikátní skupinu mikroorganismů. Typická je pro ně absence buněčné stěny. Jedná se o nejmenší bakterie, které jsou schopné samostatného života nezávisle na hostitelské buňce. Celá řada zástupců z této skupiny byla izolována v souvislosti s urogenitálním onemocněním

mužů a žen. Z hlediska ovlivnění reprodukční schopnosti jsou nejčastěji uváděny *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma parvum* a *Ureaplasma urealyticum*. Výskyt uvedených mikroorganismů kolísá v závislosti na druhu. (Vilimovská, 2016, str. 20). U *Ureaplazmy urealyticum* je nejvyšší výskyt 40 %, naopak nejnižší výskyt je u *Mycoplasma genitalium* 6 %. Nejvyšší záchyt těchto bakterií je zaznamenáván především v ženském pohlavním ústrojí.

Tab. 1: Základní charakteristika rodů mykoplazmat

Rod	Cholesterol	Hostitel	Další vlastnosti
Mycoplasma	pos.	živočichové	Mnoho patogenních druhů. Optimální pH 7,5. Průměrná velikost mikrokolonií 0,1-0,6 mm.
Ureaplasma	pos.	živočichové	Několik patogenních druhů. Optimální pH 6,0. Produkují močovinu. Průměrná velikost mikrokolonií 0,01-0,05 mm.

Zdroj: Jurajda, 2003

Mykoplasma pro růst vyžadují přítomnost cholesterolu. Hlavním hostitelem je člověk. Mají mnoho patogenních druhů a velikost mikrokolonií je 0,1-0,6 mm. Na rozdíl od Ureaplazmat, také potřebují pro svůj růst přítomnost cholesterolu a hlavním hostitelem jsou živočichové. Mají jen několik patogenních druhů, produkují močovinu a průměrná velikost jejich kolonií je 0,01-0,05 mm.

1.2 Historie vzniku

V roce 1896 byla vykultivována první mykoplasma, později pojmenovaná jako *Mycoplasma mycoides* (Freundt, 1995). Vykultivoval je E. Nocard společně s E. Rouxem z plic dobytka, které bylo postiženo pleuropneumonií. Až do roku 1929 byla

společně s dalšími mikroorganismy, které se vyskytovali při tomto onemocnění, označována jako PPLO. Tato zkratka byla vytvořena z anglického překladu „Pleuro-Pneumonia-Like Organisms“, což v překladu znamená mikroorganismy způsobující zánět poplicnice a plic (Cimolai, 2001).

Podle Taylor-Robinson (1993) byl termín mykoplazma zavedený Nowakem v roce 1929. Termín vznikl spojením dvou řeckých slov mykes (houba) a plazma (formovaný), který charakterizuje schopnost mykoplazmat vytvářet vláknité struktury a plasticitu jejich povrchové membrány.

Již v roce 1937 se objevila první zpráva o mykoplazmě, která má být získána přímo od člověka a spojená s patologickým stavem. Byl vytvořen izolovaný organismus, který byl pravděpodobně ten, co je dnes znám jako *Mycoplasma hominis* (Dienes, Edsall, 1937). Nejdříve byl pokládán za virus a až po úspěšné kultivaci na umělých půdách byl roku 1963 zařazen mezi mykoplazmata. (Bednář a kol., 1996).

Termín mykoplazma, z řečtiny Mykes (houba) a plazma (formovaný), byl nejprve použit k popisu organismů, které byly podobné pleuropneumonii v padesátých letech minulého století. Tento termín se začal velmi rychle používat a byl aplikován na všechny pleuropneumonické organismy lidského i zvířecího původu, které se v té době mohli identifikovat. V následujících letech bylo popsáno mnoho dalších lidských mykoplazmálních druhů a v roce 1954 byl poskytnut první popis T-kmenových mykoplazmat, později známy jako ureaplazmy. (Shepard, 1954)

V roce 1954 byla poprvé izolována *Ureaplasma urealyticum* u mužů s negonokokovou uretritidou. Jednalo se o zánět močové trubice, který není způsoben bakterií *Neisseria gonorrhoeae*, původcem kapavky. Nalezneme ji jak ve vagině a cervixu sexuálně aktivních žen, tak u mužů v urogenitálním systému. V roce 1937 byla poprvé izolována *Mycoplasma hominis* z abscesu Bartholinské žlázy. Vyskytuje se u zdravých lidí, kteří nemají žádné příznaky infekce (Vilimovská, 2016). V uvedeném období *Mycoplasma hominis* izolovali Dienes a Edsall (Taylor-Robinson, 1993).

1.3 Klasifikace (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*)

Mykoplasma jsou nejmenší prokaryotické buňky, které trvale postrádají buněčnou stěnu, takže nemají schopnost syntetizovat peptidoglykan. Z toho můžeme usoudit, že buňky mají stejný tvar, od struktury až po větvená nebo helikální vlákna. Na povrchu mají flexibilní trojvrstvou vnější membránu. Mykoplasma se nebarví metodou podle Grama. *Fylogeneticky se klasifikují ke grampozitivním bakteriím, netvoří endospory, obvykle jsou nepohyblivé a fakultativně anaerobní. Většina druhů je hostitelsky vysoce specifická, k replikaci nedochází v prostředí mimo hostitele.* (Fakulta veterinárního lékařství, © 2016)

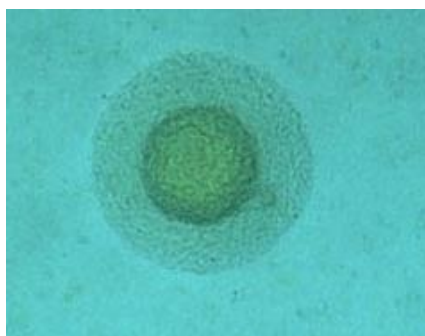
Podle Bayraktara a kol. (2010) jsou mykoplasma a ureaplasma považována za oportunně patogenní mikroorganismy (vyčkávací na oslabenost jedince), které vyvolávají infekce urogenitálního traktu u obou pohlaví. Jejich výskyt v pohlavním ústrojí žen je nejčastěji spojován s bakteriální vaginózou, cervicitidou anebo hlubokým pánevním zánětem. Kolonizace během těhotenství se považuje za rizikový faktor, při kterém je možný vznik porodních a poporodních komplikací, jako jsou například horečky v období šestinedělí, předčasný porod nebo potrat. Při průchodu porodními cestami se mohou bakterie přenést i na novorozence a vyvolat u něj pneumonie nebo meningitidy.

Mykoplasma (hlavně *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis*) běžně kolonizují dolní genitální trakt žen. Pokud proniknou do děložní dutiny, mohou způsobit u některých těhotných chorioamniotidu, infekci plodu nebo předčasný porod (Dort a kol., 2013). Základní místo výskytu, tzv. habitat, tvoří slizniční povrchy, nejvíce pak respiratorního a urogenitálního ústrojí. Mykoplasma se vyznačují jako velmi extracelulární parazité, které mají schopnost velmi těsného kontaktu s hostitelskou buňkou, ze které poté získávají přes svou stěnu i zdroje energie pro vlastní metabolismus. Rostou na nebuněčných médiích. Mnoho z nich vyžaduje ke svému růstu steroly a mastné kyseliny. Pro mykoplasma je charakteristický i způsob dělení. Kromě podvojného štěpení je u mykoplazmat časté i pučení. Jsou, na rozdíl od ostatních bakterií, citlivá k lýze osmotickým šokem a velmi krátkou dobu přežívají v suchu a za zvýšené teploty. (Moved Permanently, © 2001)

Mycoplasma hominis je pohlavně přenosná bakterie s typickým vzhledem „sázeného vejce“ (obr. 2), která způsobuje infekci ženského pohlavního ústrojí a také novorozenecké infekce. U mužů k rozvoji infekce nedochází, ale muži mohou být přenašeči této bakterie. *Mycoplasma hominis* patří do rodu Mycoplazmatacea, je to gramnegativní bakterie (přenáší se nechráněným pohlavním stykem, a to i stykem orálním). Také se může přenést během těhotenství nebo při porodu z matky na dítě. Infekce *Mycoplasma hominis* způsobuje infekce ženského pohlavního ústrojí, a to hlavně endometritidu (zánět děložní sliznice), salpingitidu (zánět vejcovodů) anebo zánět malé pánve - PID (pelvicinflammatory disease). Tyto záněty mohou velmi často přecházet do chronicity nebo vést až k neplodnosti. Pacientky, které trpí touto infekcí, mohou pociťovat bolest v podbřišku a také bolest při pohlavním styku. *Mycoplasma hominis* také velmi často nacházíme u žen, které trpí bakteriální vaginózou. Pravděpodobně to není přímý původce nemoci, ale má na jejím rozvoji podíl. K diagnostice infekcí *Mycoplasma hominis* se používají vzorky moči, stěry z děložního čípku nebo vagíny. Vzorky se dále kultivují a hodnotí pod mikroskopem. V dnešní době se čím dál častěji k detekci *Mycoplasma hominis* využívá metody PCR - polymerázové řetězové reakce. Serologická diagnostika je také možná, ale příliš se nepoužívá. (Štokr, 2008; Vosmík, 1999; Gross, 2011)

K léčbě této infekce se využívají tetracyklinová antibiotika, v případě vzniku rezistence se využívají klindamycin nebo fluorochinolony (Venerologie, © 2011).

Bakterie *Mycoplasma hominis* se vyskytuje u 50 % až 70 % případů bakteriální vaginózy a také je pravidelně izolována u pacientek s nespecifickou bakteriální vaginitou. Ženy, které mají *Mycoplasma hominis*, obvykle trpí na zvýšené pH v pochvě, které je větší jak 4,7 a i na zvýšený počet klíčových buněk. Mnohem častěji si stěžují na zapáchající výtok, s pozitivním čichovým testem a pravidelně jsou osídleny *Ureaplasma urealyticum*. Přesto *Ureaplasma urealyticum* ani *Mycoplasma genitalium* nejsou považovány za relevantní mikroby sdružené s bakteriální vaginózou. (Špaček, 2013)

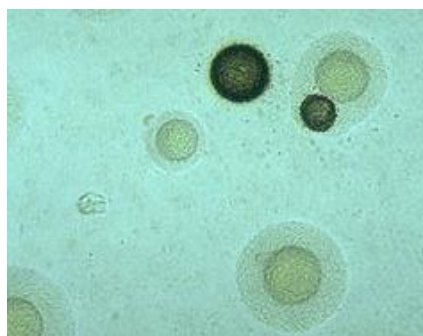


Obr. 2: *Mycoplasma hominis*
Zdroj: Robertson, Stemke, 2001

Ureaplasma urealyticum je speciální druh mikroba, který patří do řádu Mycoplazmatales a k čeledi Mycoplazmataceae. Společně s mykoplazmaty je pro ně typické, že jim chybí pevná buněčná stěna. Je rezistentní k betalaktamovým antibiotikům, protože netvoří peptidoglykan. (Votava, 2003)

Vnější obal *Ureaplazmy urealyticum* je tvořen 3vrstevnou membránou, která se skládá z lipidů a proteinů. Jedná se o nejmenší a nejjednodušší bakterie, které jsou většinou fakultativně anaerobní (mohou růst za přítomnosti kyslíku), ale v takovémto prostředí se vyvíjejí pomaleji. Ureaplasma se dříve nazývala T-forma mykoplazmat („T“ je z počátečního písmene anglického slova „tiny“, což znamená droboučkový, tvoří zcela malinké homogenně zrnité kolonie, které dosahují velikosti do 50 nm). Ureaplazmat existuje několik druhů: například *canigenitalium*, *cati*, *diversum*, *felinum* nebo *gallorale*. Pro člověka je ale nejvýznamnější *Ureaplasma urealyticum*, která se vyskytuje ve více sérotypech. Typickým znakem těchto mikroorganismů je to, že štěpí ureu a vzniká amoniak a oxid uhličitý, tzv. tvoří ureasu. (Největší informační zdroj pro lékaře, © 2009)

Ureaplasma urealyticum je velmi často izolována z urogenitálního traktu mužů i žen. Kolonizace výrazně stoupá po zahájení pohlavního života, ale je možná už při perinatálním vývoji. Výskyt se udává zhruba u 40-80 % sexuálně aktivních žen. Jsou považovány za častého původce negonokokových uretritid asi v 15-20 %, prostatid mužů, uretritid a vaginitid žen. (Deguchi a kol., 2004)



Obr. 3: *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*
Zdroj: Robertson, Stemke, 2001

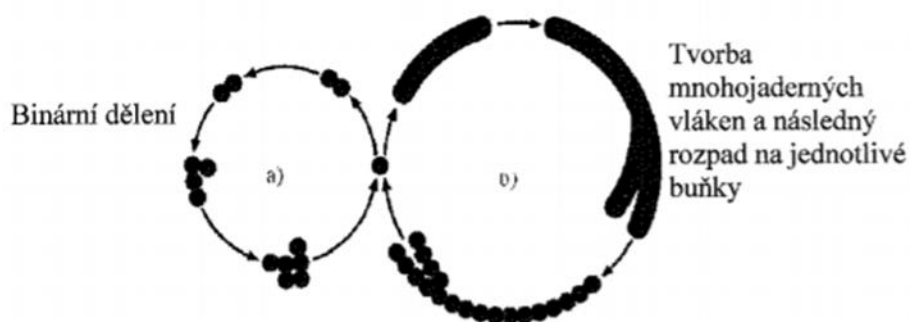
Kultivace ureaplazmat, stejně tak jako u mykoplazmat, není obtížná. Názorně vidíme mikroorganismy spolu (obr. 3), kde je *Mycoplasma hominis* (světlejší) a *Ureaplasma urealyticum* (tmavší). Oba mikroorganismy vyžadují půdy, které jsou obohaceny o prekurzory nukleových kyselin a steroly. Využívá se peptonu, kvasničného extraktu a zvířecího séra, která jsou zdrojem cholesterolu. K eliminaci ostatních bakterií slouží přídavek antibiotika působící na buněčnou stěnu. Optimální pro růst ureaplazmat je teplota 36-38°C a vyšší tenze oxidu uhličitého. Pro přímý průkaz ureaplazmat lze použít tekutá media s ureou. (Votava, 2000)

1.4 Fylogeneze a struktura genomu

Fylogeneze Mollicutes je zajímavá vzhledem k tvorbě genomu. Během evoluce se objevily mnohonásobné redukce jeho velikosti a také byl pozměněn i genetický kód. Pokud porovnáme celkové tempo evoluce, je až příliš vysoké. Jediným předpokládaným významem takovéto redukce velikosti genomu je evoluce Mollicutes na striktní parazity. Mykoplasma mají také jako další kodon pro tryptofan, zatímco u ostatních organismů je stop-kodonem.

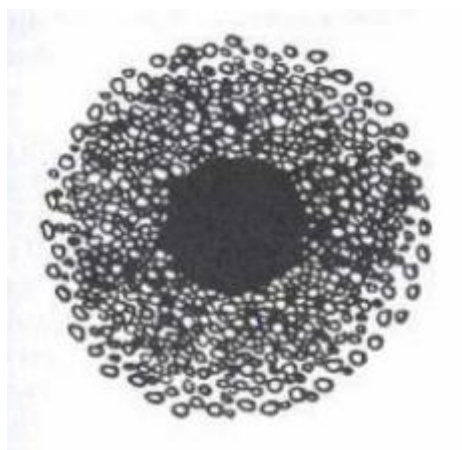
Fylogeneticky je třída Mollicutes řazena do gram-pozitivních bakterií, které se vyvinuly redukcí genomu. Tato třída obsahuje čtyři řády – Mycoplazmatales, zahrnující mikroorganismy, které způsobují infekce u lidí a zvířat, Entomoplazmatales vyskytující se u hmyzu a rostlin, Anaeroplazmatales infikující převážně ovce a skot, poslední řád je Acholeplazmatales vyskytující se u zvířat, rostlin a hmyzu. (Rottem, 2003; Stülke et al., 2009)

V současnosti je známo 8 kompletních genomových sekvencí a 4 jsou ve vývoji. Genom tvoří cirkulární DNA o velikosti přibližně od 500 kb do 1400 kb. Z lidských mykoplazmat je znám kompletní genom u *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma penetrans* a *Ureaplasma urealyticum* (Mycoplasma a ureoplazma, © 2013).



Obr. 4: Dělení mycoplazmat
Zdroj: Razin, 1981

Nejmenší jednotka mykoplazmat, která je schopná reprodukce, je kulovitá, přibližně o průměru 200-250 nm (Greenwood et al., 1999). Tyto mikroorganismy se poté množí binárním dělením (obr. 4) (Vařejka et al, 1989). Dělení cytoplazmy nemusí být synchronizováno s replikací jádra a tímto opožděným dělením vznikají mnohojaderná vlákna a řetízky, které se mohou rozpadat na kokovitá tělíska (Bednář et al., 1996). Tyto korálkovité řetízky se tvoří zaškrcováním membrány v místech mezi dvěma genomy (Greenwood et al., 1999).



Obr. 5: Struktura mycoplazmové kolonie
Zdroj: Bednář et al., 1996

Genom mykoplazmat má velikost $5 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ Da a je 4-8x menší než genom jiných bakterií (Svoboda et al., 1996). Molekulová hmotnost nejmenšího genomu je asi 45×10^6 Da, což je nejmenší obsah genetické informace nutný pro nezávislé množení mimo buňku (Greenwood et al., 1999).

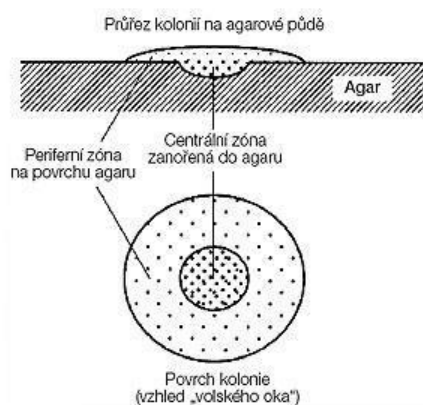
1.5 Morfologie a metabolismus

Morfologie mykoplazmat je velmi rozdílná, některé druhy mají kulovitý tvar, ovoidní, prstencovitý tvar, občas můžeme dokonce pozorovat i korálkovité nebo vláknité útvary (Votava a kol., 2003). Jsou fakultativně anaerobní a v živném médiu vyžadují přítomnost exogenních sterolů, které jsou dodávány v živočišném séru s většinou zvýšenou tenzí CO_2 v atmosféře. Rostou pomalu, jejich generační doba je od 1 hodiny do 16 hodin. (Murray, Rosenthal a kol., 2005; Votava, 2003)

Pro kultivaci *Mycoplasma hominis* se používají komplexní média, která jsou označována jako PPLO agar a PPLO bujón. Protože mají mykoplasma zvýšené nutriční požadavky, jsou média obohacována ještě o nezbytné složky, které obsahují růstové faktory. Patří mezi ně hlavně koňské sérum, které je zdrojem bílkovin, cholesterolu a nenasycených mastných kyselin. Dále se přidává kvasnicový extrakt, který je zdroj vitamínů a aminokyselin. Médium je dále doplněno o antibiotika, jako jsou PNC a AMP a octan thallný. Tyto inhibiční látky potlačují růst nežádoucí doprovodné mikroflóry.

Mycoplasma hominis, jako zdroj energie, využívá aminokyselinu arginin, kterou můžeme médium také obohatit. Inkubace probíhá nejlépe v mikroaerofilním prostředí 3 a více dnů při teplotě 37° C. *Mycoplasma hominis* má typický vzhled „sázeného vejce“ (friedegg), nevytváří hemolýzu na krevním agaru, nezkrvašuje laktózu a podílí se na štěpení argininu na amoniak. (Klaban a kol., 2005)

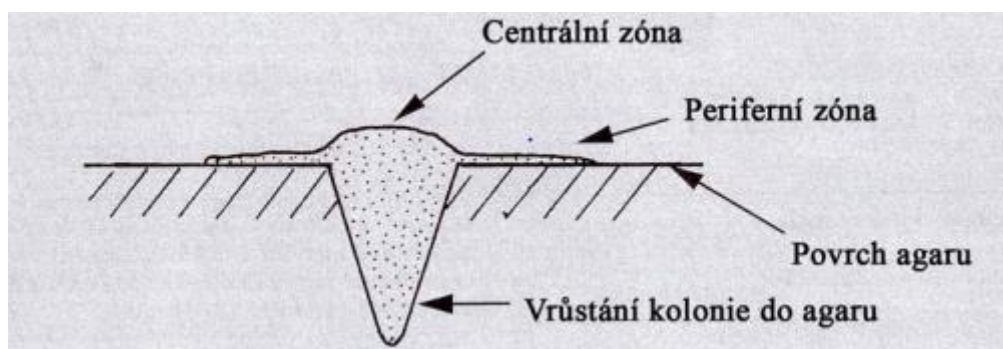
Pro kultivaci *Ureaplasma urealyticum* se také používají kultivační média (PPLO agar a PPLO bujón), jsou také obohacena o různé růstové faktory, jako je koňské sérum (to je zdrojem bílkovin), dále pak cholesterol a nenasycené mastné kyseliny. Dále se také přidává kvasnicový extrakt, který je zdrojem vitamínů a aminokyselin, stejně jako u *Mycoplasma hominis*. Hlavním substrátem je urea, která se štěpí ureázou na oxid uhličitý a amoniak. Do kultivačního média se společně s ureou přidává ještě fenolová červen jako acidobazický indikátor. Uvolněný amoniak ureáza-pozitivní kmeny alkalizuje kultivační prostředí a pH se tím posunuje směrem do zásadité oblasti. Vzestup pH je poté indikován změnou barvy fenolové červeně ze žluté a do sytě červené. Inkubace probíhá také nejlépe v mikroaerofilním prostředí 2-3 dny při teplotě 37° C. (Klaban a kol., 2005)



Obr. 6: Kolonie mycoplazmat na agarové půdě

Zdroj: Křemenová, 2007

Obecně nezávisí velikost kolonií jen na druhu mykoplazmat, ale také na složkách a stupni hydratace média, na koncentraci agaru, na atmosférických podmínkách a na stáří kultury (Parker a Duerden, 1993). Kolonie je nutno pozorovat mikroskopicky.



Obr. 7: Průřez kolonií mykoplazmat
Zdroj: Quinn et al., 1994

Na obrázku můžeme vidět rozdělení na centrální a periferní zónu. Dále pak hranici mezi povrchem agens a vrůstáním kolonie do agaru.

1.6 Patologie *Mollicutes*

Jelikož jsou mykoplazma extracelulární parazité, hlavními faktory jejich virulence jsou adherentní proteiny. Vyznačují se heterogenní strukturou povrchovým antigenů, které jim umožňují odolávat složkám imunitního systému (Olson a kol., 1991). *Mycoplasma hominis* má na svém povrchu několik proteinových antigenů. Je to například Vaan antigen, který je hlavní povrchový protein zajišťující adhezi *Mycoplasma hominis* k povrchu sliznic. Má schopnost přizpůsobit se prostředí urogenitálního i respiračního ústrojí a také podmínkám uvnitř kloubů (Zhang a Wise, 1996). Dalším známým povrchovým proteinem je Lmp, který pomáhá shlukování buněk *Mycoplasma hominis*. Tato schopnost je významná pro kolonizaci sliznic, protože jednotlivé buňky *Mycoplasma 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).

Mykoplasma bývají spojena s několika chronickými nemocemi, včetně únavového syndromu, syndromu Války v zálivu a revmatoidní artritidy. Je jednoznačná spojitost mezi těmito chorobami a mykoplazmovými infekcemi, ale souvislost zatím zůstává nejasná. U pacientů s chronickým únavovým syndromem byla zjištěna mykoplasma u 50 % pacientů. Také bylo zjištěno, že více než 50 % pacientů s revmatoidní artritidou mělo mykoplazmové infekce a 36 % z nich mělo mnohočetné mykoplazmové infekce způsobené různými druhy mykoplazmat. Ačkoliv je jasné spojení mykoplazmové infekce s výše vyjmenovanými chorobami, není zcela zřejmé, která je prekurzorem. Mykoplasma mohou vyvolávat různé infekce nebo mohou být oportunním patogenem, který kolonizuje hostitele s oslabeným imunitním systémem a způsobí sekundární infekci (Mycoplasma a ureoplazma, © 2013).

Druhy, které jednoznačně způsobují onemocnění u člověka, jsou *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*. Vliv druhu *Mycoplasma genitalium* na lidské zdraví je v současné době hodně diskutovaným a zkoumaným tématem. U ostatních druhů mykoplazmat nebyla souvislost s lidským onemocněním dosud jednoznačně prokázána.

1.7 Gynekologické infekce

V ekosystému, který nás obklopuje, je člověk neustále v kontaktu s nejrůznějšími bakteriemi. Důležité jsou nejen vztahy mezi jednotlivými mikroorganismy, ale i jejich interakce s hostitelskou tkání. Toto platí i pro osídlení pochvy. Součástí osídlení pochvy je endogenní hostitelská flóra a exogenní mikroorganismy, které vstupují do interakce s hostitelskou mikroflórou. Význam poševní mikroflóry je velmi důležitý, protože se uplatňuje nejen při chirurgických výkonech v oblasti pochvy a děložního hrdla, ale i při císařském řezu. Velká většina právě pooperačních a poporodních infekcí je vyvolána právě mikroorganismy, které najdeme jako běžnou součást mikrobiální flóry dolního genitálního traktu. Některé gynekologické operace mohou probíhat v relativně čistém prostředí, u hysterektomie (chirurgické odstranění dělohy), obvykle prováděné gynekologem, nastává kontaminace vaginální flórou. Kontaminace může provázet i císařský řez, v případě, kdy se provádí chorioamnionitis, probíhá řez již v prostředí vysloveně infekčním. Je snaha o zkrácenou předoperační hospitalizaci na minimum,

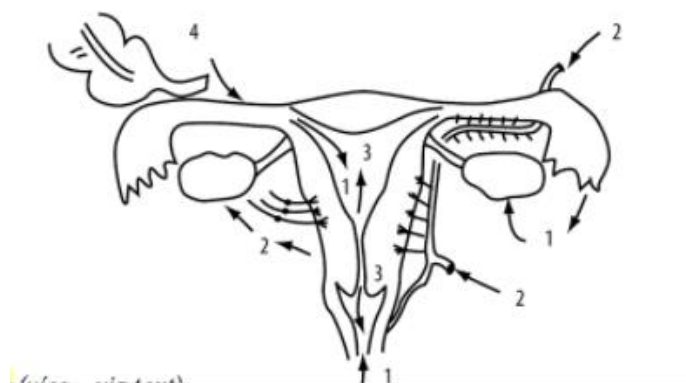
kvůli možnému riziku nozokomiálních infekcí a tím i minimalizována možnost nozokomiálního osídlení a následné nozokomiální nákazy. Základním požadavkem při vzniku infekce je provedení odběrů pro bakteriologické vyšetření, dále pak pro mikroskopické a kulturační vyšetření, zjištění etiologického agens a zjištění jeho citlivosti k antibakteriálním látkám. Takovýto odběr by měl být proveden ještě před zahájením antibakteriální léčby. Nejzávažnější infekce v porodnictví jsou způsobeny hlavně streptokoky jako je *Streptococcus agalactiae* a také bakteriemi *Chlamydia trachomatis* nebo *Mycoplasma hominis*, které jsou přenášeny pohlavním stykem. (Doležal, 2007)

Gynekologické záněty patří mezi infekční onemocnění, která způsobují především bakterie, viry, kvasinky a paraziti. Mohou být způsobeny také mechanicky či vzniknout v důsledku alergie, a to v případě zánětů vulvy a pochvy. Za jeho vznikem může být také lupénka anebo může být původ zcela neznámý. Gynekologické záněty postihují hlavně vaječníky, vejcovody, děložní vazy a povázky pánevní. Infekce se nejčastěji šíří vzestupně, to znamená, že začne v pochvě a pokračuje dále do děložní dutiny k vejcovodům a vaječnickům, dále pak až na povázku pánevní a děložní vazy. Infekce se také může přenášet lymfatickými cestami anebo krví, ale takovýto přenos je méně častý. Rychleji pak infekce postupuje po porodech, potratech, nebo po různých instrumentálních zákrocích v děložní dutině nebo při invazivních diagnostických metodách, jako je například hysteroskopie a laparoskopie, dále při menstruaci nebo po zavedení nitroděložního antikoncepčního tělíška. Nejvíce postihují gynekologické záněty hlavně mladé ženy v plodném věku. Kdyby záněty nebyly léčeny, mohly by přejít do chronické formy nebo často recidivují, to znamená, že po ukončení se znovu vrátí zpět. (© 2011)

Zánětlivá onemocnění se u žen vyskytují poměrně často, mimo jiné také díky anatomické stavbě genitálu. Patří sem komunikace zevního prostředí s peritoneální dutinou přes reprodukční orgány a také funkce reprodukčního systému, jako je menstruace, pohlaví styk, porod nebo šestinedělí. Obecně bychom mohli říci, že má frekvence zánětů narůstající trend, hlavně v mladším fertlím věku. Infekce mají velmi pestrý klinický obraz, od asymptomatických a lehkých forem až po velmi závažné

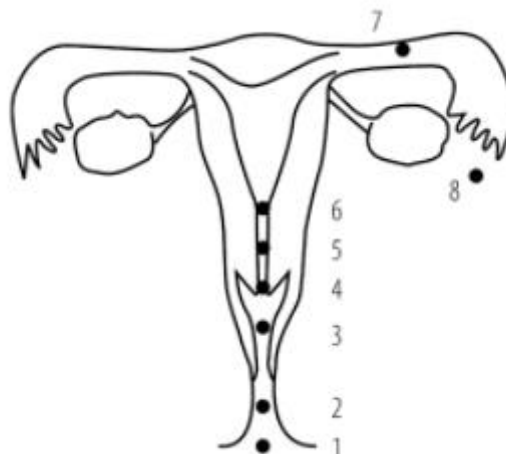
smrtící sepse. Jak bylo uvedeno dříve, záněty reprodukčního systému velmi často recidivují. (Slezáková, 2017)

Mykoplasma mohou napadnout pohlavní soustavu ženy a způsobit zánět pochvy nebo dělohy. Přenos je většinou sexuální cestou. Příznaky nejsou nijak silné, ale mohou být doprovázeny bolestí svalů nebo kloubů. Vážnou komplikací jsou na druhou stranu hluboké pánevní záněty, které postihují v břiše uložené pohlavní orgány ženy, jako jsou záněty vejcovodů nebo vaječníků. Ty pak mohou způsobit až neplodnost. Infekce těhotných žen poté zvyšuje riziko předčasného porodu a potratu. (Mykoplazmové infekce, © 2011)



Obr. 8: Cesty šíření infekce
Zdroj: Slezáková, 2017

Obrázek 8 nám znázorňuje cesty šíření infekce. První cesta je tzv. ascendenní (má vzestupné šíření), infekce se šíří z pochvy, to nám ukazuje číslo 1. Číslo 2 nám ukazuje tzv. hematogenní šíření, to znamená, že infekce prochází z břišních orgánů krví. V bodě 3 můžeme pozorovat tzv. descendenní šíření, což je sestupné šíření infekce. Číslo 4 nám ukazuje tzv. přímé šíření, to znamená, že infekce se šíří z jiných orgánů břicha jako je například appendix nebo močové cesty. (Slezáková, 2017)



Obr. 9: Přírozené obranné mechanisny
Zdroj: Slezáková, 2017

Tělo se také chrání přirozenými obrannými mechanizmy (obr. 9). Číslo 1 symbolizuje uzavřenou stydkou štěrbinu, číslo 2 je hymen, číslo 3 kyselý pH pochvy – způsobené přítomností laktobacilů, číslo 4 uzavřená zevní branka děložního hrdla, číslo 5 je hlenová zátka na děložním čípku, číslo 6 je uzavřená vnitřní branka děložního hrdla, číslo 7 je směr kmitání řasinek vejcovodu a číslo 8 jsou fimbrie uzavírající vejcovody. (Slezáková, 2017)

1.8 Urogenitální infekce

Za možného původce zánětů urogenitálního traktu bývají považovány *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*. Přenos je možný pohlavní stykem, ale je však pravděpodobné, že infekci lze získat i jinými cestami. Mykoplasma jsou sice častěji nacházena u sexuálně aktivních osob, ale vyskytují se i u sexuálně neaktivních jedinců (Roztočil a kol., 2011). Tyto bakterie jsou velmi často nalézány v ženském pohlavním ústrojí. *Ureaplasma urealyticum* asi u 50 % sexuálně aktivních žen, *Mycoplasma hominis* asi u 30-40 %. Mykoplasma se vyskytují častěji u nengonokokových uretritid a u žen s anaerobní vaginózou. (Roztočil a kol., 2011)

1.9 Močové infekce

Infekce močových cest je velmi časté onemocnění. Vedle infekcí horních cest dýchacích představuje nejčastější infekční onemocnění v populaci. U novorozenců je infekce močových cest častější u chlapců jak u dívek. U dětí mezi jedním a pěti roky roste prevalence bakteriurie u děvčat (k 5 %), zatímco u chlapců klesá pod 0,5 %. Mezi 20. - 50. rokem věku jsou infekce močových cest až 50x častější u žen. Později stoupá incidence infekce močových cest u obou pohlaví a přibližuje se zastoupení mužů a žen. Většina infekcí močových cest je vyvolána gramnegativními bakteriemi. Hlavním patogenem je *Escherichia coli*, která se vyskytuje až v 70-80 % případů. *M. hominis* je často izolována z horních močových cest. (Teplan a kol., 2004)

1.10 Genitální infekce

Mykoplasma bývají velmi často součástí normální mikrobiální flóry. U sexuálně aktivních osob se nacházejí až v 70 %, zato výskyt u nemocných s urogenitální infekcí je 2-4x vyšší. Mohou být také hlavním etiologickým agens, a to zejména u imunodeficitního organismu. Mykoplasma jsou součástí smíšené flóry u nespecifických uretritid, kde *Mycoplasma hominis* je v zastoupení více než 20 % a *Ureaplasma urealyticum* nad 52 %.

Podílejí se přímo na vzniku nechlamydiové nespecifické uretritidy v 18-45 %. U žen mohou být příčinou salpingitidy nebo pyelonefritidy (Dvořáková, 2009).

1.11 Infekce plodu a novorozence

V posledních letech se mění pohled na význam infekčních onemocnění v těhotenství. Dříve byly ve velké pozornosti hlavně ty infekce, které působí poškození plodu v průběhu gravidity nebo jeho smrt. Typickým příkladem těchto infekcí byly syfilis, zarděnky, toxoplazmóza a jiné. Na základě současných znalostí se můžeme domnívat, že velká část předčasných porodů je vyvolána infekcí genitálního traktu. Po bližším zkoumání se ve většině případů prokazuje přítomnost bakterií, které vyvolávají bakteriální vaginózu, jako jsou streptokoky skupiny B a mykoplasma. Tyto

mikroorganismy pronikají ascendentně z pochvy a cervixu do děložní dutiny, kde se infikuje plodová voda. (Mašata, 2008)

Přenos *Mycoplasma hominis* se děje sexuální cestou a novorozenci jsou infikováni v porodním kanálu. Inkubační doba je 2-3 týdny. Infekce poté vede k těžkému respiračnímu onemocnění novorozence, může se rozvinout až sepse (Muntau, 2009).

Mycoplasma hominis a *Ureaplasma urealyticum* jsou zřejmě odpovědní i za některé případy chorioamniitidy, což je zánět plodových obalů a plodové vody. K zánětu dochází vzestupem infekce z pochvy. Chorioamniitida se projevuje celkovými známkami infekce zánětu, objevují se výrazné kontrakce a tachykardie plodu. Nebezpečnou komplikací může být přestup infekce na placentu, posléze na plod a vznik septického stavu až šoku u matky. Jako léčba se podávají antibiotika s celkovým a antibiotika s lokálním účinkem, která se aplikují přímo do amniové dutiny. Dále je vyvoláván předčasný porod, aby se předešlo výše zmíněnému septickému stavu. Mykoplazmatům se připisuje též nízká porodní hmotnost novorozenců a poporodní horečka. Ureaplasma byla také izolována z vnitřních orgánů potracených plodů a předčasně narozených dětí. Kolem interpretace těchto nálezů je však ještě mnoho otázek a nejasností. (Taylor-Robinson, 1999)

1.12 Příznaky mykoplazmatické infekce

Při projevech mykoplazmatické infekce záleží na typu bakterie, která ji způsobila. Mykoplazmová infekce, která je způsobena bakterií *Mycoplasma hominis* se u žen projevuje v počátečním stadiu takto: ženy trpí nepřírodným výtokem, svěděním pochvy a pálením při močení. Pokud již má *Mycoplasma hominis*, je žena pouze přenašeč a infekce se u ní nerozvíjí. Infekce se může přenést z těhotné ženy na dítě. Přenáší se pohlavním stykem, a to i stykem orálním. Pokud se nemoc neodhalí včas a nedojde k zahájení léčby, může to mít za následek zánět děložního hrdla, vejcovodů anebo vaječnicků. Infekce se potom promění v chronickou a v horším případě může vést až k neplodnosti žen. Problémy způsobuje i v těhotenství. Může dojít k infekci plodové vody, což znamená vznik novorozeneckých infekcí. Miminko může poté přijít na svět se zápallem plic anebo s meningitidou.

Postižený mykoplazmovou infekcí může trpět intermitentní (přerušovanou) horečkou s nočními poty. Dále může trpět chronickou únavou nebo kožním zarudnutím. Někdo trpí zvýšenou kožní citlivostí, bolestí kloubů a svalů, otoky se sníženou pohyblivostí kloubů, dále pak bušením srdce, žaludečními křečemi nebo dvojitým viděním atd. (Mykoplazmová infekce, mykoplazmata, © 2009).

Trochu jiný druh infekce, s jinými projevy, způsobuje bakterie *Ureaplasma urealyticum*. Infekce způsobená touto bakterií se nazývá ureaplazmatická infekce. Většina osob, která je nakažena touto bakterií netrpí žádnými potížemi. Tato bakterie je běžně přítomna v genitáliích mužů a žen. Pokud dojde ke komplikacím, může dojít k vaginálním infekcím u žen a také k zánětům močové trubice u mužů. Infekce se také, jako u předchozí bakterie, přenáší pohlavním stykem. U mužů tato bakterie způsobuje v pokročilém stadiu záněty močové trubice, záněty varlete, nadvarlete nebo i prostaty. Podle některých studií může bakterie ovlivňovat i pohyblivost spermií, což může v nejhorším případě vést až k neplodnosti. Ženy tyto infekce trápí více jak muže (Mykoplazmová infekce, pohlavní nemoci, © 2016).

1.13 Diagnostika

Základem vyšetřovacího postupu je pečlivá opakovaná anamnéza a fyzikální vyšetření. Diagnostická strategie musí zahrnovat zvážení pravděpodobných příčin vzhledem k věku, pohlaví a klinickému stavu pacienta. Dále musíme zvážit zátěž a rizika vyšetřovacích metod pro konkrétního pacienta, roli hraje i jejich cena. Hodnotíme také diagnostickou validitu výsledků provedených vyšetření, zejména pak sérologické a imunologické testy, které mohou být i falešně pozitivní. (Lukáš, Žák, 2014)

Ke stanovení přítomnosti *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* se využívá přímý a nepřímý průkaz stanovení. K detekci *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis* můžeme použít kultivační vyšetření. Oba dva potenciální patogeny lze anaerobně kultivovat na specificky obohacených kultivačních agarových médiích. Další možnost přímé detekce je také molekulárně mikrobiologické vyšetření pomocí PCR.

Klinický materiál je vhodný odebírat do transportního média, protože Mykoplazma i Ureaplazma jsou velice citlivá na vyschnutí. Klinický materiál, který je vhodný k vyšetření metodou PCR, je moč. Tu neodebíráme do média, ale do sterilní odběrové nádoby, stejně jako urogenitální výtěry a další materiály z potenciálně zasažených míst infekce, jako je plodová voda apod. (Vilmovská, 2016).

Odběr vzorku provádíme zásadně před zahájením léčby. Vzorek moče se odebere v množství 50-100 ml do sterilní nádoby se širokým hrdlem. Vzorek je ihned odeslán řádně označen do laboratoře, nejpozději však do 24 hodin. Pokud je transport nebo laboratorní zpracování opožděno, musí být vzorek skladován a transportován ve 4°C. Průvodní list, který se přikládá ke každému vzorku, musí obsahovat vedle identifikace pacienta i diagnózu důvodnou pro indikaci požadovaného vyšetření, dále datum odběru a údaje o odesílateli. (Teplan, 2004)

1.14 Léčba

Mykoplazma jsou pestrá skupinou bakterií, která si netvoří klasickou buněčnou stěnu. To vyřazuje účinek řady antibiotik, která jsou schopna ostatním bakteriím blokovat tvorbu buněčné stěny a tím je poškozovat. Jedná se zejména o penicilin a jemu podobná antibiotika (Štefánek, © 2014).

K léčbě používáme antibiotika, která nasazujeme minimálně na 7 dní. Jako nejvhodnější se využívají tetracyklinová antibiotika, v případě, že vůči nim nastane rezistence, volíme klindamycin nebo fluorchinolony.

Mycoplasma jsou rezistentní k betalaktamovým antibiotikům, trimetoprimu, silfonamidům (otrimoxazolu) a rifampicinu (Marek, 2010).

1.15 Fluorchinolony

Fluorchinolony nebo zkráceně chinolony, jsou antibiotika, jejichž působení je poněkud slabší než u penicilinů a cefalosporinů, ale mají lepší průnik do tkání. V současné době se používají hlavně pro léčbu infekcí močových cest a trávícího ústrojí. Mohou být podávány formou tablet nebo infuzí. Nesmějí být předepsány těhotným ženám ani dětem do 18 let, protože u některých přípravků se vyskytly vážné

nežádoucí reakce. Některými vlastnostmi i svým terapeutickým uplatněním je fluorochinolonům blízký kotrimoxazol. Naopak tetracykliny mají nižší účinnost, používají se hlavně k léčbě lehkých infekcí dýchacího ústrojí v ambulantní praxi. Jejich hlavní předností je výborný průnik do různých tkání, hlavní nevýhodou je poměrně rychlé šíření rezistence mezi běžnými patogenními mikroby. Doménou jejich působení jsou proto infekce vyvolané drobnými bakteriemi, jako jsou chlamydie nebo mykoplasma. Tyto bakterie žijí a množí se uvnitř buněk hostitele, čímž připomínají viry. (Navrátil, 2008)

1.16 Tetracykliny

Obecně jsou mykoplasma citlivá k antibiotikům, jako jsou tetracykliny a makrolidy. Mechanismu jejich účinku je inhibice proteosyntézy v bakteriálních buňkách. V posledních letech se ale objevují kmeny *Mycoplasma hominis*, které jsou na tyto antibiotika rezistentní. Je to způsobeno získáním tetM genu, který, jak bylo zjištěno, se přenáší mezi bakteriemi v urogenitálním traktu (Roberts a kol., 1985). Tato rezistence je pravděpodobně ovlivněna geografickými faktory, antibiotickým tlakem a sexuální promiskuitou u dospělých (Waites et al., 2005).

1.17 Makrolidy

Všechna makrolidová antibiotika mají stejný mechanismus účinku na citlivé mikroorganismy. Po průniku do bakteriální buňky zastavují proteosyntézu blokováním peptidové vazby. Buňka proto není schopna syntetizovat potřebnou bílkovinu a hyne. Makrolidy jsou málo toxické a rychle se vstřebávají ze zažívacího traktu (Havlík, 2010).

V České republice jsou na trhu tyto makrolidová antibiotika. Spiramycin je účinný proti grampozitivním mikroorganismům. Jeho spektrum účinku se zhruba shoduje se spektrem erythromycinu. Dalším je Roxitromycin, který má poměrně široké využití. Využívá se jak na streptokokové infekce (angína, záněty středního ucha aj.), tak velice dobře působí na mikroorganismy. Klaritromycin, je na rozdíl od erythromycinu stabilní v kyselém prostředí zažívacího ústrojí. Dobrá tolerance kyselého prostředí se také podílí

na dobrém pronikání do bílých krvinek, které se nazývají fagocyty. Fagocyty se vyskytují v místě zánětu a pohlcují cizorodé mikroorganismy.

1.18 Prevence

Pohlavně přenosné choroby jsou v populaci běžné. Propracované diagnostické metody k průkazu intracelulárních patogenů z této skupiny nám v současnosti umožňují prokázat tuto příčinu i u řady klinických syndromů. Objevují se ale i další patogeny, jejichž průkaz zatím v běžné klinické praxi je nedostupný. Příkladem je *Mycoplasma genitalium*, u kterého již byla prokázána humánní patogenita, proto se stala nedílnou součástí PCR panelů. (Takashi, 2002)

Hned prvním problémem prevence je i nedostatečná spolupráce s nemocným a jejich partnery a vysoká nakažlivost těchto infekcí. Velmi často jsou lidé neochotni dodržovat chráněný pohlavní styk s kondomem nebo sexuální abstinenci. Partneři se také nedostavují k vyšetření a léčbě. Podle statistik se muži častěji vyhýbají provedení odběru uretrálního sekretu i moderními odběrovými sety, které jsou dnes přizpůsobeny pro uretrální dyskomfort, spojený s odběrem. Tato problematika se již částečně vyřešila možností použít vyšetření bez nutnosti odběru z uretry. K průkazu se používají například metody PCR, LCR nebo vyšetření mykoplazmat genovou sondou s první, nejlépe ranní močí, a serologická vyšetření rodově specifických protilátek metodou ELISA. (Kolombo, 2004)

Dalším problémem, při prokázání pohlavně přenosné choroby, je při dnešním častém používání antibiotik výskyt alergických reakcí, gastrointestinální intolerance nebo vznik rezistentních mikrobiálních kmenů. K rozvoji rezistence bakteriálních kmenů vůči antibiotikům se nelze zcela ubránit.

Další důležitou prevencí je informovanost. Oba partneři by měli být informováni o charakteru tohoto onemocnění a o riziku přenosu infekce mezi partnery. Při zjištění rezistentních kmenů je pak velmi důležitá spolupráce s antibiotickými středisky. Jako záložní antibiotikum pro infekce způsobené ureaplazmaty se v našich podmínkách jeví streptograiny, které u nás ve větším rozsahu nejsou využívány, a proto můžeme ve větším rozsahu počítat s jejich efektivností.

Další důležité opatření, pro laickou a mnohdy i odbornou veřejnost, je šíření informací o současných infekcích a celé této problematice, dále popularizovat užívání kondomů, zvláště pak pro mladší věkové skupiny s rizikovým chováním. (Kolombo, 2004)

II. VÝZKUMNÁ ČÁST

2 Cíle práce a výzkumné otázky

2.1 Cíle práce

Hlavní cíl bakalářské práce byl rozdělen do tří dílčích částí:

- 1) Shromáždit dostupnou literaturu a vypracovat rešerši na téma Význam kmenů Mollicutes při urologických infekcích;
- 2) Ovládnout laboratorní techniku vyšetřovaných kmenů Mollicutes z urologického biologického materiálu (na kmeny *Mycoplasma hominis* a na kmeny *Ureaplasma urealyticum*);
- 3) Shromáždit výsledky výzkumného šetření v České republice a v zahraničí. Tyto výzkumy komparovat.

2.2 Výzkumná otázka

Otázka: Jaká je četnost výskytu kmenů Mollicutes při urogenitálních infekcích?

Na tuto otázku se pokusíme odpovědět tak, že nejprve zjistíme frekvenci výskytu *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* pomocí dvou metod, a to kultivační analýzou a metodou PCR.

3 Metodika výzkumu

Abychom získali správné výsledky vyšetřovaného biologického materiálu, je nezbytné, aby byla dodržena pravidla pro odběr biologického materiálu, jeho skladování a transport (Krška a kol., 2011).

Odběr moči se provádí sterilně do sterilních odběrových souprav. Je nutné, aby vše bylo opravdu odebráno sterilně. Takto získaný materiál je přepraven do laboratoře, kde se s ním dále pracuje následujícím způsobem. Pro detekci mycoplazmat a ureaplazmat se pracuje s panelem sexuálně přenosných chorob. Tento panel obsahuje 7 kmenů, z nichž 2 jsou ureaplazma a 2 mykoplazma. V panelu se detekuje *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* a *Trichomona Vaginalis*. Vše se detekuje ze stěrů (např. cervic, močová trubice) a moče.

Vyšetřovaným materiálem byla moč. Se sedimentem lze dále pracovat dvěma možnými způsoby, a to kultivační metodou, která je založena na stanovení biochemické aktivity. Dále pak metodou PCR, která slouží k mnohonásobnému zmožení určité části DNA. Obě tyto metody patří mezi metody přímého průkazu.

Pro svůj výzkum jsem využila ruční izolaci DNA mykoplazmat a ureaplazmat, kterou popisuji v další části práce.

3.1 Vyšetřovaný materiál

Pokud chceme získat spolehlivý výsledek, je nutné dodržet podmínky před vlastním provedením analýzy, tzv. preanalytickou část. Nerespektování preanalytických vlivů způsobuje chybný výsledek nebo jeho nesprávné hodnocení. Výsledky laboratorního vyšetření mohou být ovlivněny následujícími faktory: osoba pacienta, odběr vzorku, transport vzorku, uchovávání vzorku před analýzou a příprava vzorku ke zpracování.

Vyšetřovaným materiálem uváděným v této práci byla moč, která byla následně testována na pozitivitu *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*. Pacient s urogenitálními potížemi je lékařem poučen o správném sběru moče. Tento sběr pacient provádí do lékařem vydané sterilní nádoby (falkony). Do těchto komerčně

dodávaných sterilních falkon pacienti zachytí moč, velmi důležité je upozornit pacienta, aby moč zachytával v prvním proudu, pokud bude následovat laboratorní vyšetření metodou PCR. V tomto případě se první proud zachytává z toho důvodu, že *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* patří mezi intrabuněčné parazity a pro metodu PCR je nutné zachytit co nejvíce buněk, které jsou právě v prvním proudu. Pokud by laboratorní vyšetření bylo prováděno kultivační soupravou, je nutné zachytit střední proud moče, a to proto, že v prvním proudu se vyskytuje mnoho bakterií, které by zkreslily pozitivitu výsledku. Pacienti, kteří byli zařazeni do našeho výzkumu, byli vybíráni podle požadavků lékaře na vyšetření *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* v Nemocnici České Budějovice a.s.

Byla jsem přítomna u odběru vzorků, který prováděl lékař u pacientů. Za dobu mého působení na pracovišti laboratoře (měsíční stáž) se nevyskytl ani jeden vzorek stěru potřebný k vyšetření na pozitivitu *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*.

3.2 Metody použité při vlastní analýze

Vlastní vyšetřování materiálu jsem prováděla v Nemocnici v Českých Budějovicích a.s., v laboratoři molekulární biologie a genetiky. Při izolaci DNA jsem použila dvě metody, a to metodu ruční izolace DNA a metodu izolace DNA pomocí izolátoru. Tyto metody jsem si sama také vyzkoušela. Dále jsem použila kultivační metodu, kterou používala laboratoř v Kladně a Bratislavě. Laboratorního vyšetření v Kladně jsem se zúčastnila pouze jako pozorovatel, ale způsob užití kultivační metody mi byl vysvětlen.

3.2.1 Kultivační metody

Kultivační metody jsou založeny na principech kultivace a biochemických reakcích. Kultivační médium se připraví smícháním lyofilizovaného prášku, který obsahuje inhibitory a podporuje růst Mycoplasmat, a diluentu. Po kultivaci dochází u *Ureaplasmy urealyticum* k rozkladu, rozkládá se urea pomocí ureázy, a k uvolnění NH_3^3- . Podobně to probíhá u *Mycoplasma hominis*. Zde se rozkládá arginin pomocí

arginázy s následným uvolněním NH_3 . NH_3 poté zvýší pH v tekutém médiu a tím dojde ke změně barvy, která indikuje výsledek. (© 2019)

3.2.2 Metoda polymerázové řetězové reakce

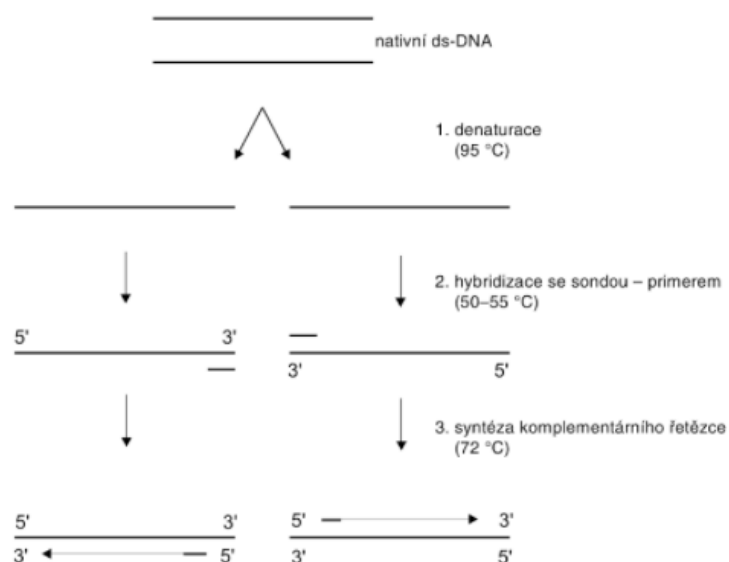
Ke správnému uchopení obou předchozích metod je nutné představit metodu polymerázové řetězové reakce, která patří do molekulárně biologických metod.

Molekulárně biologické metody mají velký význam při studiu druhů bakteriální mikrobioty pochvy, které se nedaří vůbec, nebo jen velmi obtížně kultivovat. Hlavně metoda PCR a sekvenace odhalily neznámé skutečnosti o složení a poměrech na poševní sliznici, mj. i mykoplazma. Navíc tyto metody umožňují dnes již nejen detekci a identifikaci bakterií, ale také stanovení jejich množství. Citlivost PCR metod v případě detekce a identifikace odpovídá 88 až 98 %. Podobně vyšly PCR techniky ze srovnání s kulturační metodou také v případě *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*. (Špaček, Buchta a kol., 2013)

Pomocí amplifikačních metod, patří sem nejčastěji polymerázová řetězová reakce (PCR), je vybraná část genomu viru nebo bakterie zmnožena do takového množství, které je možné detekovat dalšími technikami (elektroforézou nebo hybridizací). Správná volba biologického materiálu, ze kterého je možné nukleovou kyselinu pomocí molekulárně biologické metody detekovat, závisí hlavně na patogenezi infekčního onemocnění. Protože stabilita nukleové kyseliny se může velmi lišit v závislosti na typu mikrobiálního původce onemocnění, také na typu použitelného antikoagulačního činidla, na době transportu, na teplotě během transportu a uchování vzorku, je velmi důležité dodržovat správná pravidla pro odběr, transport a uchování vzorku. (Štěpánová et. al., 2002)

Polymerázová řetězová reakce je metoda, která umožňuje detekci vybrané sekvence DNA pomocí její amplifikace, při použití sekvenčně specifických primerů a DNA polymerázy. Metoda PCR je založena na opakujících se cyklech, kdy každý z těchto cyklů je složen ze tří po sobě jdoucích kroků (obr. 10). V prvním kroku je dvouřetězcová DNA tepelně denaturována za vzniku jednořetězcové DNA, v druhém

kroku nasedají primery na hledanou sekvenci DNA a v posledním kroku se syntetizují komplementární vlákna. (Bouchalová, Hajdúch, 2016)



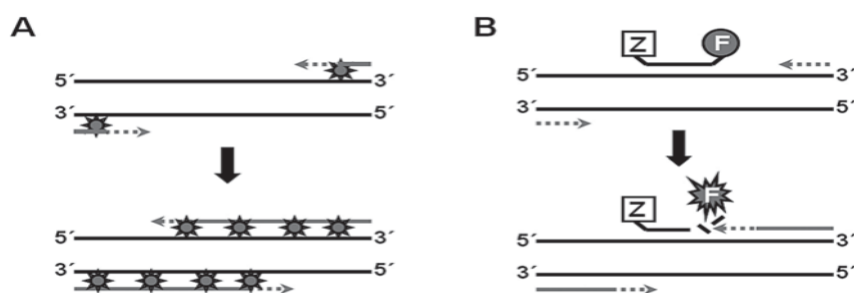
Obr. 10: Schéma reakce PCR
Zdroj: Bartůňková, Paulík, 2011

3.2.3 Metoda polymerázové řetězové reakce v reálném čase

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase představuje moderní aplikaci běžně používané techniky polymerázové řetězové reakce (PCR). Umožňuje nám jak rychlou detekci, tak i specifickou kvantifikaci produktu reakce. Standardní PCR reakce nám umožňuje amplifikaci úseků DNA za pomoci párů specifických primerů, které ho ohraničují a termostabilní Taq polymerázy. Principem této reakce je opakované střídání cyklů, při nichž dochází ke zdvojování specifického úseku DNA ve třech krocích, denaturace templátové DNA, nasedání primerů a syntéze specifických úseků. Za

ideálních podmínek tak dochází k exponenciálnímu růstu počtu kopií produktu. (Šafářová, © 2016)

Při použití nespecifických fluorescenčních barviv jako je např. SYBR Green nebo netoxický EvaGreen, nebo hydrolytických sond (systém flouorchrom - zhášec) je možné sledovat aktuální průběh reakce, tj. PCR v reálném čase. (Šafářová, © 2016)



Obr. 11: Princip využití nespecifických a specifických sond při PCR v reálném čase
Zdroj: Hrstka, Kolářová, Michalová, Vojtěšek, 2014

3.2.4 Příprava PCR

Izolace nukleových kyselin

Pro PCR detekci je nutné nejdříve vyizolovat nukleové kyseliny. Izolace je většinou prvním krokem molekulárně biologických metod. Izolace nukleových kyselin zahrnuje 3 základní kroky, tj. rozrušení buněk pomocí proteinázy K při 56°C, odstranění kontaminant a vlastní extrakce nukleových kyselin. Připravíme PCR Mastermix s následným přenesením na kolonku.

Příprava PCR Mastermix

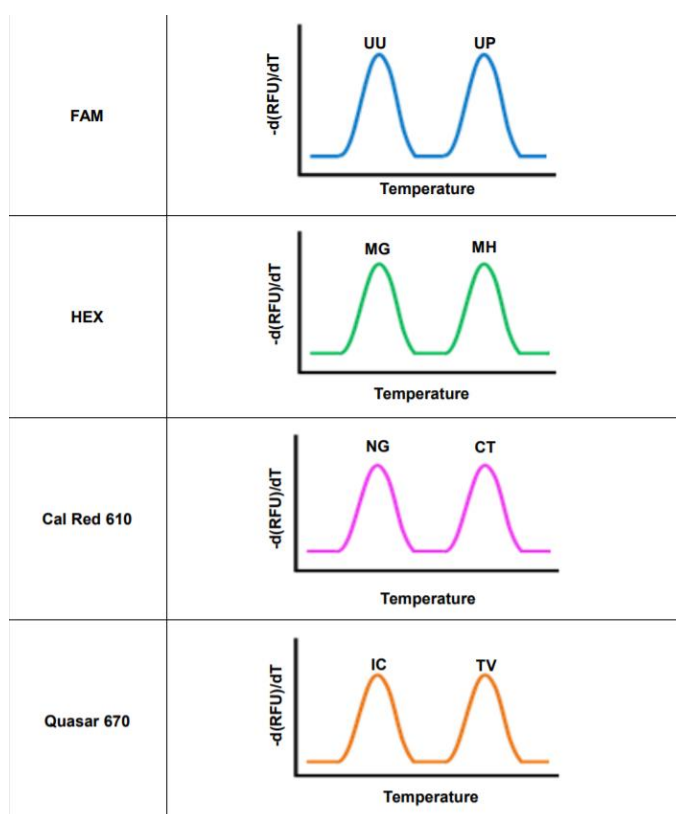
Pro přípravu PCR Mastermix bylo nutné smíchat jednotlivé reagenty: 5µl 4X STI-7 TOM, 5µl 4X Anyplex PCR Master Mix (s UDG) a 5µl Rnase-free Water. Tento mix se připravuje v jiné místnosti než samotná analýza. Následně se mix přepipetuje na

kolonku do jednotlivých zkumavek a přidá se vyizolovaná nukleová kyselina. Takto připravené zkumavky se vloží do cycleru CFX96 Real Time System (Bio-Rad), kde se nastaví teplotní profil.

Teplotní profil PCR reakce

Teplotní profil se nastaví následujícím způsobem: 95°C po dobu 15 minut – počáteční denaturace DNA, 95°C po dobu 30 sekund – denaturace, 60°C po dobu 1 minuty – připojení primerů a 72°C po dobu 30 sekund – polymerační reakce. Tyto kroky se cyklicky opakují. Počet cyklů je 50, poté se odečítá fluorescence. Na konci programu proběhne tzv. Melting curve neboli Analýza tání, tj. 55 – 85°C po dobu 5 sekund. (Anyplex™ II)

Po skončení celé analýzy se provede vyhodnocení výsledků podle obrázku 12.



Obr. 12: Analýza výsledků
Zdroj: Anyplex™ II

V levém sloupci na obrázku 12 jsou uvedeny fluorofory (fluorescenční barviva), pravý sloupec ukazuje na pozitivní kontroly. Vyhodnocení probíhá po skončení analýzy, kdy na přístroji vidíme podobné grafy jako zde na obrázku. Podle toho, v jaké barvě a při jaké teplotě došlo k nárůstu fluorescence, odečteme výsledek a vidíme, jaká bakterie je ve vzorku přítomna.

3.3 Metoda ruční izolace DNA

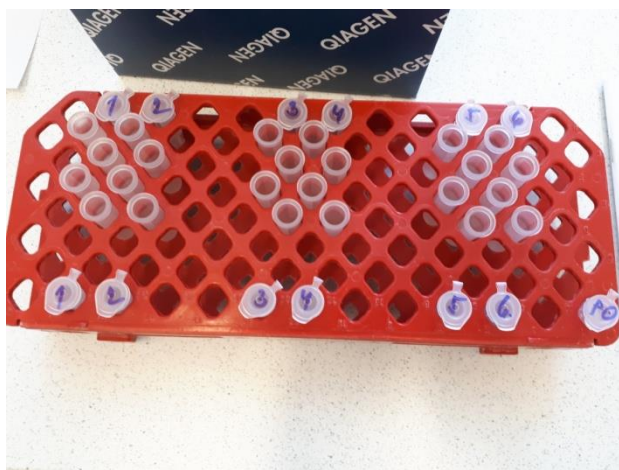
Pro analýzu vzorků jsem zvolila metodu ruční izolace DNA. Nejprve jsem si připravila pracovní roztok AL-Pufu podle následující tabulky.

Tab. 2: Příprava roztoku AL-Pufu

Objem AL (ml)	Objem DNA – AVE (μl)
2,20	61,6

Zdroj: vlastní

Tyto dva roztoky jsem důkladně promíchala a stočila v centrifuze, aby nic nezůstalo na stěnách a víčku zkumavky. Zkumavky pro vzorky jsem si připravila do stojanu (obr. 13). Do každé zkumavky jsem dala 20 μl proteinázy K, k ní jsem přidala 180 μl připraveného roztoku podle tabulky 2 a dále bylo přidáno 200 μl vzorku.



Obr. 13: Stojan se zkumavkami
Zdroj: vlastní foto

Takto připravené vzorky jsem zvortexovala a dala do termostatu na 60 minut při teplotě 56°C (obr. 14). Vše se průběžně vortexovalo.



Obr. 14: Termostat s nastavenou teplotou 56°C
Zdroj: vlastní foto

Po vyndání vzorků z termostatu jsem přidala 200 μ l AL pufru a vortexovala jsem vše po dobu 15ti sekund. Tento krok je důležitý, protože vzorek byl ve vysoké teplotě a začal se srážet ve formě kapek na stěnách a víčku zkumavky. Stočením a zvortexováním vše ze stěn a z víčka spadne dolů. Poté jsem vzorky inkubovala v 70°C 15 minut s následnou centrifugací.

Přidala jsem 200 μ l 99,9 % ethanolu, který vzorek vysráží. Znovu jsem vše zvortexovala a krátce centrifugovala. Po centrifugaci jsem vše převedla na kolonku. Vše jsem dala stočit na 6 000 otáček na 2 minuty.

Po stočení jsem na kolonku přidala 500 μ l promývacího roztoku AW 1 a opět jsem vše centrifugovala na 6 000 otáček po dobu 2 minuty. Dále jsem přidala promývací roztok AW 2 a centrifugaci opakovala na 13000 otáček na 4 minuty.

Kolonky jsem přendala do sterilních 1,5 ml mikrozkušavek. Přidala 100 μ l AE pufru temperovaného na 56°C. Zkušavky jsem otevřela a nechala 3 minuty stát při pokojové teplotě, aby se vyvázala DNA. Následně jsem opět provedla centrifugaci na 6 000 otáček na 1 minutu. Vše jsem poté vložila do cycleru k analýze.

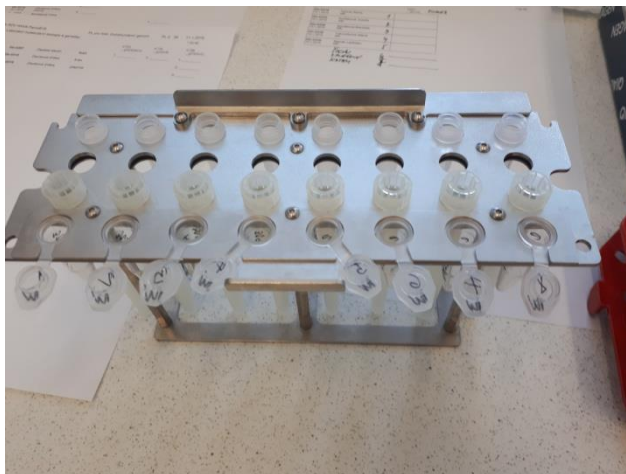


Obr. 15: Cyclar CFX96 Real-Time System
Zdroj: vlastní foto

3.4 Izolace DNA pomocí izolátoru

Při práci se vzorky jsem si také osvojila izolaci DNA pomocí izolátoru. Tato metoda je řízena přístrojově; stručně popisují izolaci DNA.

V prvním kroku je důležité si zkumavky popsat. Připravila jsem si stojan se zkumavkami a popsala je (obr. 16).



Obr. 16: Stojan se zkumavkami
Zdroj: vlastní foto

Ve stojanu se zkumavkami jsou v první řadě (dále od čtenáře) připraveny zkumavky pro vložení Proteinázy K, do řady, kde ještě nejsou umístěny zkumavky, se následně napipetuje roztok pufru a v prostřední řadě jsou umístěny špičky pro pipetování. Nejbližší jsou umístěny sběrové eppendorfky.

S takto připraveným stojanem se dále pracuje následujícím způsobem: do poslední řady jsem napipetovala 200 μ l vzorku, 20 μ l Proteinázy, 10 μ l Poly-A a 10 μ l interní kontroly. Interní kontrola slouží k tomu, aby se při vyhodnocování nevyskytla chyba. Kdyby kontrola vyšla pozitivní, ukazovalo by to na falešnou pozitivitu. Takto si zkontrolujeme, že PCR proběhla dobře.

V dalším kroku jsem stojan vložila do izolátoru (obr. 17). Před samotným spuštěním bylo nutné izolátor nastavit. Nastavuje se číslo programu, množství vzorku, v tomto případě 200 μ l a 60 μ l konečného množství.

Izolátor se zahřeje na požadovanou teplotu, izolace trvá zhruba 1 hodinu. Poté jsem vzorky vyndala. Stojan je nutné vymýt lihem a izolátor vysvítit UV lampou z důvodu desinfekce přístroje. Vzorky jsem přepipetovala na destičku a vložila na 2 hodiny do cycleru.



Obr. 17: Analyzátor
Zdroj: vlastní foto

Izolace pomocí izolátoru se od ruční izolace liší tím, že při izolaci pomocí izolátoru se separace děje pomocí magnetických kuliček, které fungují na principu afinity záporného náboje. Ruční izolace probíhá také na principu afinity náboje, ale zde se nukleové kyseliny přichytí na membráně.

4 Výsledky výzkumu

V našem výzkumu jsme se snažili o porovnání dvou metod, a to metody polymerázové řetězové reakce (PCR), kterou používá Nemocnice České Budějovice, a.s. a kultivační metodu používanou Oblastní nemocí Kladno, a.s. Do porovnání jsme také zahrnuli výsledky Centrální laboratoře v Bratislavě, které byly publikovány v časopise Alpha medical Urológia. Výsledky jsou uvedeny i procentuálně a graficky zpracovány.

4.1 Výsledky výzkumu v Nemocnici České Budějovice, a.s.

Vlastní vyšetření materiálu bylo prováděno v Nemocnici České Budějovice, a.s. v laboratoři molekulární biologie a genetiky v lednu 2019. Tato nemocnice je největším zdravotnickým zařízením v Jihočeském kraji a zároveň jedním z největších zdravotnických zařízení v České republice.

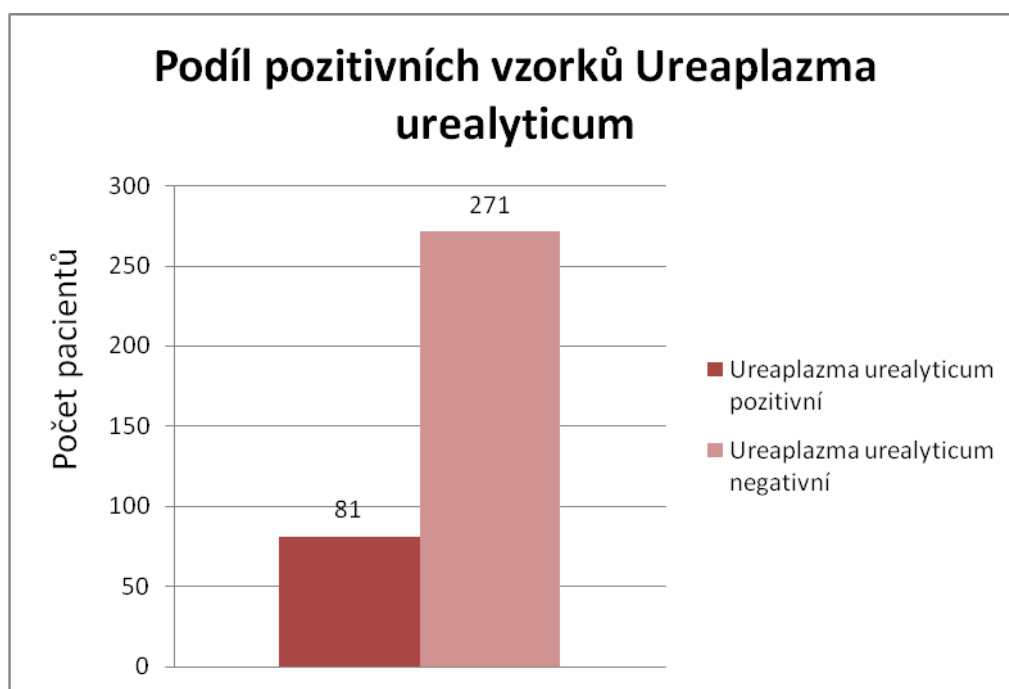
Vzorky byly odebírány od pacientů na různých odděleních nemocnice, např. kožní, dětské, urologické ad., a poté byly přepraveny do laboratoře, kde byla provedena analýza metodou PCR.

Při zpracování vzorku jsem byla přítomna a osobně jsem si vyzkoušela PCR metodu. Měla jsem možnost detekovat 20 vzorků moče na pozitivitu *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*. Již z tohoto malého počtu vzorků byla jasně vidět převaha positivity na *Ureaplasma urealyticum*.

V Nemocnici České Budějovice, a.s. byl také proveden sběr materiálu za rok 2018. Výsledky jsem statisticky vyhodnotila a graficky zaznamenala. Od 1. 1. 2018 do 31. 12. 2018 zde bylo vyšetřeno 531 pacientů s podezřením na pozitivitu *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*. Z celkového počtu 352 vzorků bylo testováno 352 vzorků na *Ureaplasma urealyticum* a 352 na *Mycoplasma hominis*. Vzorky byly odebírány z moče na různých odděleních nemocnice (kožní, dětské, gynekologické, urologické ad.) a následně přepraveny do laboratoře, kde byla provedena analýza pomocí metody PCR.

Pozitivních *Ureaplasma urealyticum* bylo 81 (23 %) a 51 (14 %) pozitivních vzorků na *Mycoplasma hominis*. Tyto hodnoty jsem analyzovala a následně graficky zpracovala.

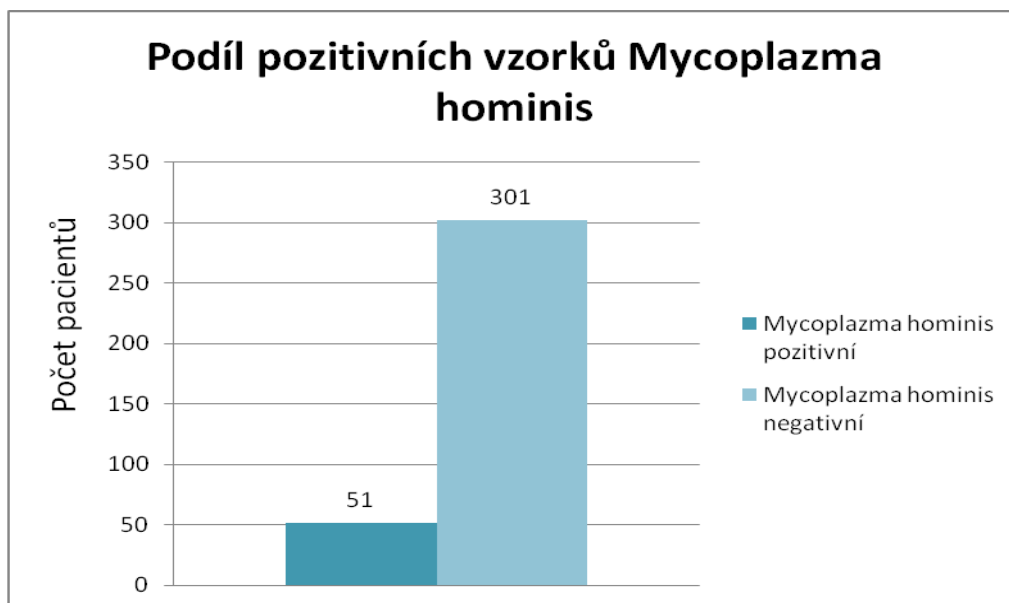
Graf 1: Podíl pozitivních a negativních vzorků *Ureaplasma urealyticum*



Zdroj: vlastní

Z grafu 1 můžeme vyčíst podíl počtu pozitivních a negativních vzorků *Ureaplasma urealyticum*. Celkový počet vzorků na tento kmen byl 352, z toho pozitivních vzorků bylo 81, což bylo 23 %.

Graf 2: Podíl pozitivních a negativních vzorků *Mycoplasma hominis*



Zdroj: vlastní

Z grafu 2 můžeme vyčíst podíl počtu pozitivních a negativních vzorků *Mycoplasma hominis*. Celkový počet vzorků na tento kmen byl 352, z toho pozitivních bylo 51 vzorků, což představuje 14 %.

Při porovnání obou grafů můžeme vidět, že pozitivní vzorky *Ureaplasma urealyticum* výrazně převyšují pozitivitu vzorků *Mycoplasma hominis*.

4.2 Výsledky výzkumu v Oblastní nemocnici Kladno, a.s.

Vlastní analýzu a sběr materiálu jsem prováděla na mikrobiologickém oddělení Oblastní nemocnice v Kladně, a.s. Tato nemocnice je nemocnicí Středočeského kraje, která plní nadregionální funkci.

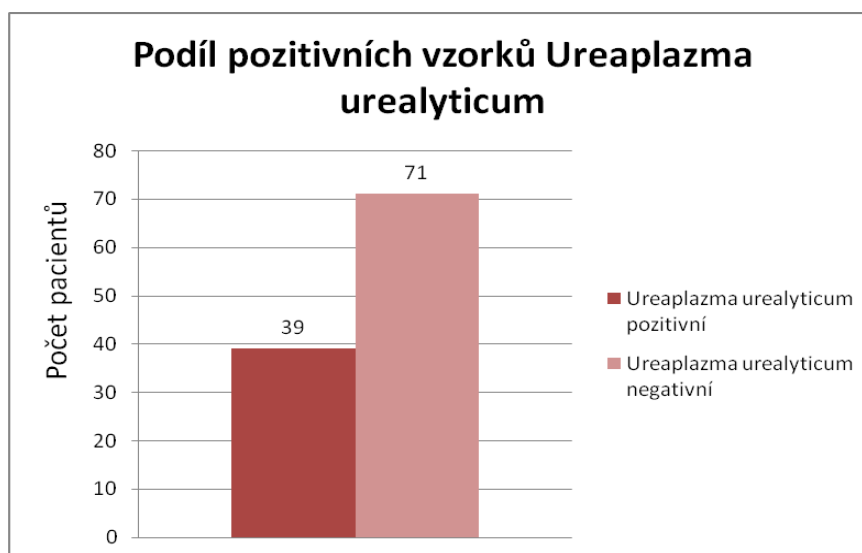
Během září 2018 jsem byla přítomna u analýzy 14 vzorků moče. Tyto vzorky byly vyšetřeny na výskyt *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* pomocí komerčně vyráběné soupravy C-PI-M-105 Mycoplasma – test (Biosynex S.A.). Vyšetření jsem osobně neprováděla, ale byla jsem velmi podrobně seznámena s technikou kultivační metody. Z tohoto malého počtu vzorků bylo také jasně vidět, že převažuje pozitivita na *Ureaplasma urealyticum*.

Od 1. ledna 2016 do 1. ledna 2017 byl proveden roční sběr materiálu v Oblastní nemocnici Kladno, a.s. Výsledky tohoto sběru mi byly předány již zanalyzované, vlastního odběru ani laboratorního vyšetření jsem se neúčastnila. Výsledky jsem pouze statisticky vyhodnotila a uvedla v grafech 3 a 4.

V roce 2016 bylo v Oblastní nemocnici Kladno, a.s. vyšetřeno 110 pacientů s podezřením na pozitivitu *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*. Z celkového počtu 220 vzorků bylo testováno 110 na pozitivitu *Ureaplasma urealyticum* a 110 na *Mycoplasma hominis*. Vzorky byly odebírány převážně z moče, pouze jeden vzorek byl odebrán výtěrem z uretry. Vzorky byly odebírány v urologické ambulanci, kožní ambulanci, dětském oddělení, dětské ambulanci, gynekologickém oddělení, nefrologické poradně, interním oddělení, chirurgickém oddělení, nervovém oddělení a posléze přepraveny do laboratoře, kde byla provedena analýza pomocí komerčně vyráběné soupravy C-PI-M-105 *Mycoplasma* - test (Biosynex S.A.).

Z tohoto počtu odebraných vzorků bylo 41 pozitivních bez ohledu na druh, přičemž z tohoto množství výrazně převyšoval počet pozitivních *Ureaplasma urealyticum*, tj. 39 (35,5 %), *Mycoplasma hominis* pouze 2 pozitivní vzorky (1,8 %). Tyto hodnoty jsem analyzovala a následně graficky zpracovala.

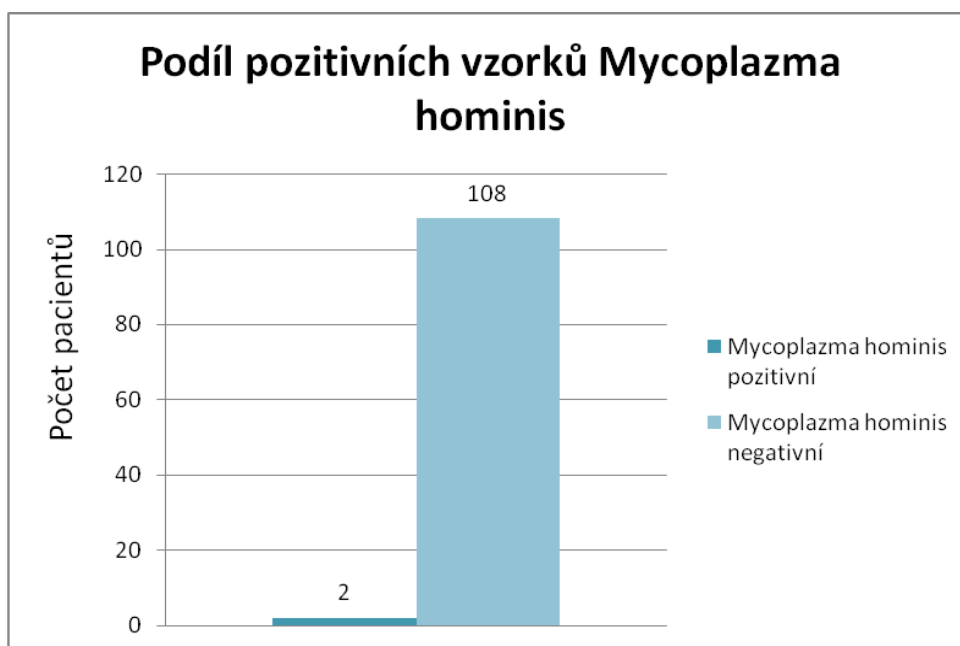
Graf 3: Podíl pozitivních a negativních vzorků *Ureaplasma urealyticum*



Zdroj: vlastní

Z grafu 3 můžeme vyčíst podíl počtu pozitivních a negativních vzorků *Ureaplasma urealyticum*. Celkový počet vzorků na tento kmen byl 110, z toho pozitivních vzorků bylo 39, což bylo 35,5 %.

Graf 4: Podíl pozitivních a negativních vzorků *Mycoplasma hominis*



Zdroj: vlastní

Z grafu 4 můžeme vyčíst podíl počtu pozitivních a negativních vzorků *Mycoplasma hominis*. Celkový počet vzorků na tento kmen byl 110, z toho byly pouze 2 vzorky pozitivní, což představuje 1,8 %.

Při porovnání obou grafů můžeme vidět, že pozitivní vzorky na *Ureaplasma urealyticum* opět výrazně převyšují pozitivitu vzorků *Mycoplasma hominis*.

4.3 Výsledky Centrální laboratoře v Bratislavě – Slovenská republika

Centrální laboratoř ZÁPAD v Bratislavě analyzovala v letech 2010 - 2013 klinický materiál, který byl vyšetřován na detekci a stanovení citlivosti vůči antibiotikům u *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*.

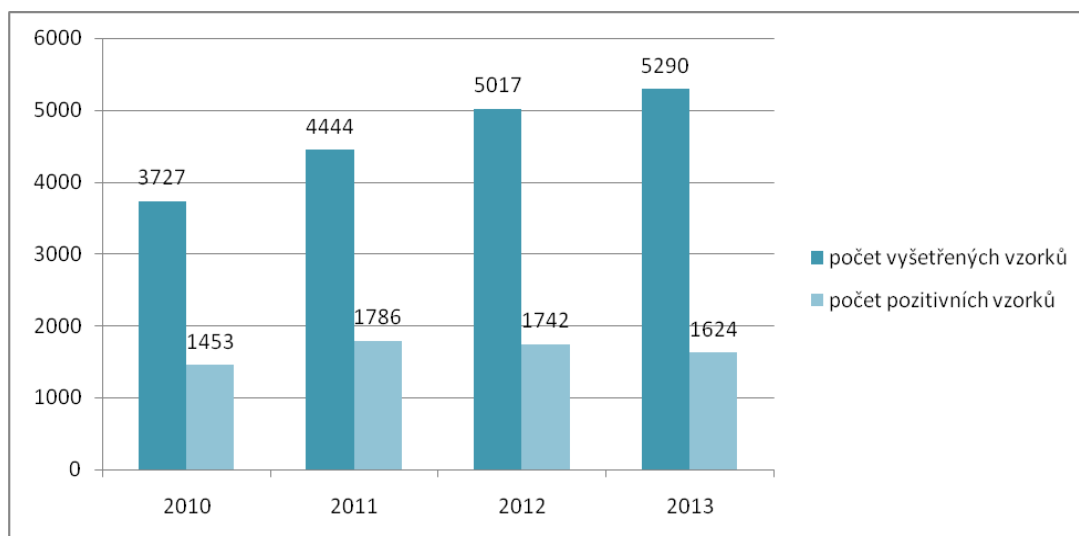
Postup vyšetření Centrální laboratoře v Bratislavě byl následující. Naočkované transportní médium přelili do kultivačního média a promíchali. Do každé jamky stripu Mycoview inokulovali po 100 µl kultivačního média. Přidali 2 kapky parafínu. Strip ve stojanu přelepili fólií a inkubovali při 36 - 37°C po dobu 24 - 48 hodin v termostatu. Zbylé kultivační médium odložili do ledničky na 48 hodin. Po uplynutí inkubačního času odečetli výsledek testu.

Přítomnost *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* byl dokazován ze stěru cervixu, uretry, pochvy a v menším případě z moči. Vyšetření výtěru z uretry nebo z pochvy jsou citlivější než vyšetření z moči. Klinický materiál se odebíral vždy před léčbou antibiotiky. Stanovení těchto mikroorganismů dokazovali komerčními soupravami Mycoplasma DUO a Mycoview. Testy jsou založené na specifických metabolických vlastnostech každého mikroorganismu. *Ureaplasma urealyticum* štěpí ureu a *Mycoplasma hominis* štěpí arginin. Metabolismus těchto substrátů vede k alkalizaci média. Pozitivní reakce po 24 - 48 hodinách inkubace jsou viditelné změnou barvy pH indikátoru ze žluté na růžovou. (Kružílková, 2016)

Za čtyři roky (2010 - 2013) bylo vyšetřeno 18 500 vzorků určených na identifikaci *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*. V jednotlivých letech bylo rozvrstvení vzorků následující.

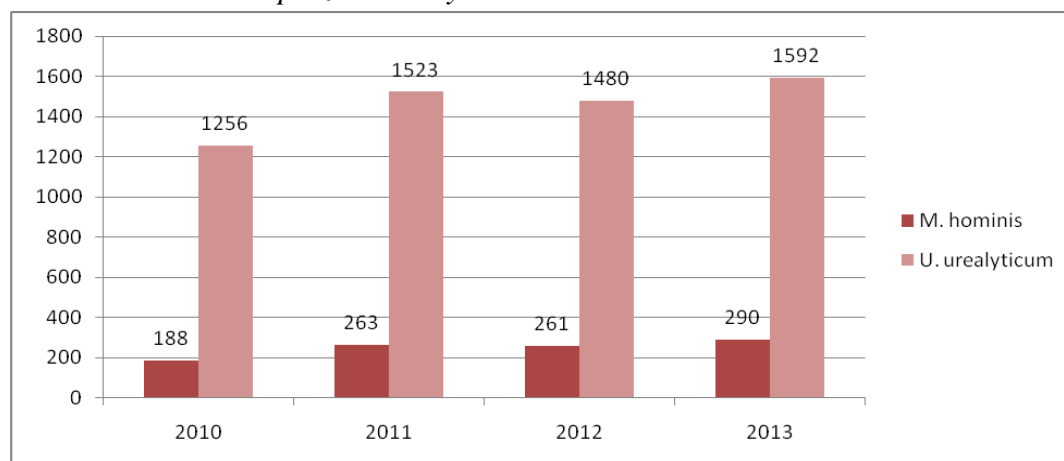
V roce 2010 bylo vyšetřeno 3 727 vzorků, z toho pozitivních na *Mycoplasma hominis* bylo 188 (5 %). Pozitivita na *Ureaplasma urealyticum* bylo prokázána u 1 256 vzorků (33,7 %). V roce 2011 laboratoř vyšetřila 4 444 vzorků, pozitivních na *Mycoplasma hominis* bylo 263 (5,9 %) a pozitivních *Ureaplasma urealyticum* 1 523 (34,3 %). V roce 2012 bylo vyšetřeno 5 017 vzorků. Pozitivita *Mycoplasma hominis* byla prokázána u 261 vzorků (5,2 %), naopak *Ureaplasma urealyticum* 1 480 (29,5 %). V posledním roce sledovaného šetření bylo posláno na vyšetření pozitivitu 5 290 vzorků, přitom pozitivních na *Mycoplasma hominis* bylo 290 (5,5 %) a *Ureaplasma urealyticum* 1592 (30,1 %). Výsledky vzorků z jednotlivých let jsou uvedeny v následujících grafech.

Graf 5: Počet všech vyšetřovaných vzorků a podíl pozitivních vzorků s identifikovanou *Mycoplasma hominis*



Zdroj: Kružlíková, Kunová, 2016

Graf 6: Počet všech vyšetřovaných vzorků a podíl pozitivních vzorků na *Ureaplasma urealyticum*



Zdroj: Kružlíková, Kunová, 2016

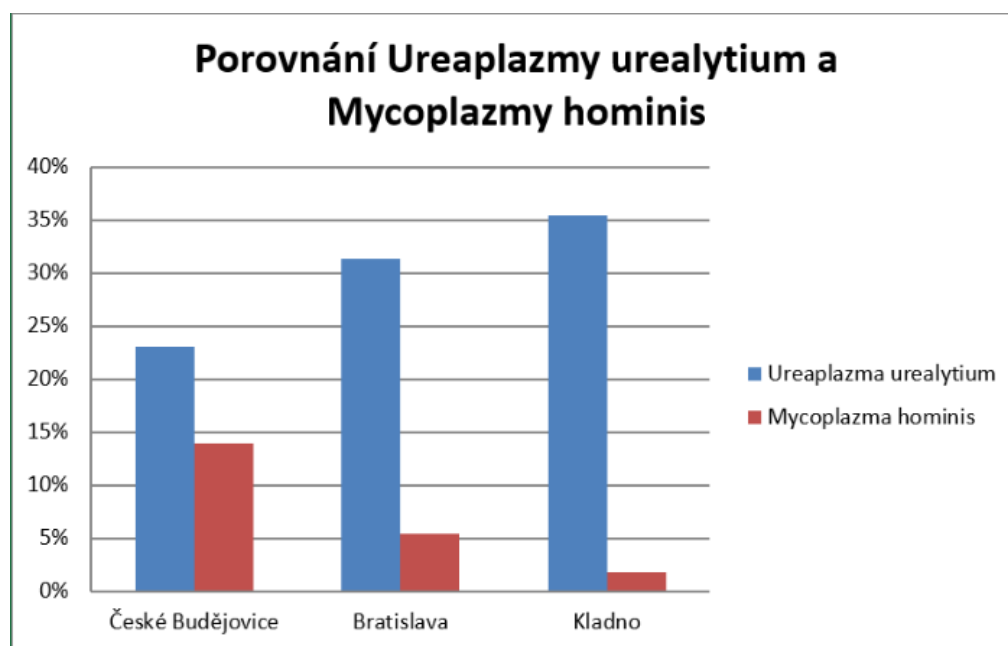
Centrální laboratoř v Bratislavě vyšetřovala přítomnost *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* převážně ze stěru z cervixu, uretry a pochvy, menším množstvím z moči, a to vždy před léčbou antibiotiky. Z počtu 18 500 vzorků bylo více jak

6 800 vzorků (37%) pozitivních bez ohledu na druh, přičemž v objemu vzorků výrazně převyšoval počet pozitivních na *Ureaplasma urealyticum* (5 851 vzorků, tj. 8 %).

4.4 Porovnání celkových výsledků

V následujícím grafu je uvedeno porovnání dvou metod, a to metody polymerázové řetězové reakce (PCR), kterou používá Nemocnice České Budějovice, a.s. a kulturační metodu používanou Oblastní nemocnicí Kladno, a.s. Do porovnání byly také zahrnuty výsledky Centrální laboratoře v Bratislavě, které byly publikovány v časopise Alpha medical Urológia v roce 2016.

Graf 7: Celkové porovnání výskytu *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum*



Zdroj: vlastní

Po porovnání výsledků z Nemocnice České Budějovice, a.s., Oblastní nemocnice Kladno, a.s. a Centrální laboratoře v Bratislavě jsme zjistili, že výrazně převyšovala pozitivita na *Ureaplasma urealyticum* u všech tří sledovaných pracovišť.

5 Diskuze

Ureaplasma urealyticum a *Mycoplasma hominis* patří k poměrně častým etiologickým agens akutních a chronických infekcí urogenitálního traktu. Neléčené akutní infekce mohou přejít do chronicity a mohou být i důvodem neplodnosti pacientů. Proto je diagnostika a terapie urogenitálních infekcí způsobených *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* velmi důležitá.

Názvy mykoplasma a ureaplasma se užívají jako triviální označení kteréhokoli mikroba třídy Mollicutes bez ohledu na to, jestli patří do těchto rodů, či nikoli (Konečná, 2010). Podle Gdoura a kol. (2007) tvoří mykoplasma a ureaplasma unikátní skupinu mikroorganismů, které jsou schopné samostatného života nezávisle na hostitelské buňce. U *Ureaplasmy urealyticum* je nejvyšší výskyt 40 %, naopak nejnižší výskyt je u *Mycoplasma genitalium* 6 %. Nejvyšší záchyt těchto bakterií je zaznamenáván především v ženském pohlavním ústrojí (Vilimovská, 2016).

Podle Bayraktara a kol. (2010) jsou mykoplasma a ureaplasma považována za oportunně patogenní mikroorganismy (vyčkávací na oslabenost jedince), které vyvolávají infekce urogenitálního traktu u obou pohlaví. Jejich výskyt v pohlavním ústrojí žen je nejčastěji spojován s bakteriální vaginózou, cervicitidou anebo hlubokým pánevním zánětem. Rizikový faktor převažuje zejména během těhotenství (*Mycoplasma* a *ureoplasma*, ©2013).

Mycoplasma hominis je pohlavně přenosná bakterie, která způsobuje infekci ženského pohlavního ústrojí a také novorozenecké infekce. Muži mohou být přenašeči této bakterie (Štork, 2008; Vosmík, 1999; Gross, 2011). *Mycoplasma hominis* má na svém povrchu několik proteinových antigenů, které zajišťují adhezi *Mycoplasma hominis* k povrchu sliznice. Proto mají schopnost přizpůsobit se prostředí urogenitálního i respiračního ústrojí a také podmínkám uvnitř kloubů (Zhang a Wise, 1996).

Ureaplasma urealyticum je velmi často izolována z urogenitálního traktu mužů i žen. Kolonizace výrazně stoupá po zahájení pohlavního života, ale je možná už při perinatálním vývoji. Pokud dojde ke komplikacím, může dojít k vaginálním infekcím u žen a také k zánětům močové trubice, varlete, nadvarlete nebo i prostaty u mužů. Podle některých studií může bakterie ovlivňovat i pohyblivost spermií, což může v nejhorším

případě vést až k neplodnosti. Ženy tyto infekce trápí více jak muže. Výskyt se udává zhruba u 40 - 80 % sexuálně aktivních žen. (Mykoplazmová infekce, pohlavní nemoci, ©2016)

Základem diagnostického vyšetřovacího postupu je pečlivá opakovaná anamnéza a fyzikální vyšetření, která zahrnuje zvážení pravděpodobných příčin vzhledem k věku, pohlaví a klinického stavu pacienta (Lukáš, Žák, 2014). K detekci *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis* lze použít kultivační vyšetření. Oba dva potenciální patogeny lze anaerobně kultivovat na specificky obohacených kultivačních agarových médiích. Další možnost přímé detekce je také molekulárně mikrobiologické vyšetření pomocí PCR (vhodná je moč, urogenitální výtěry ad.) (Vilmovská, 2016).

K léčbě lze použít antibiotika, která se nasazují minimálně na 7 dní. Jako nejvhodnější se využívají tetracyklinová antibiotika. V případě, že vůči nim nastane rezistence, volí se klindamycin nebo fluorochinolony. (Marek, 2010)

V našem výzkumu jsme se snažili o porovnání dvou metod, a to metody polymerázové řetězové reakce (PCR), kterou používá Nemocnice České Budějovice, a.s. a kultivační metodu používanou Oblastní nemocnicí Kladno, a.s. Do porovnání jsme také zahrnuli výsledky Centrální laboratoře v Bratislavě, které byly publikovány v časopise Alpha medical Urológia.

Porovnáním získaných výsledků z Oblastní nemocnice Kladno, a.s. (metoda kultivační) a výsledků Centrální laboratoře v Bratislavě (metoda kultivační) jsme zjistili, že výrazně převyšovala pozitivita na *Ureaplasma urealyticum*. Pozitivita *Ureaplasma urealyticum* dosahovala v nemocnici Kladno 35,5 % a v laboratoři Bratislava 31,9 %. Oproti tomu pozitivita *Mycoplasma hominis* byla v nemocnici Kladno 1,8 % a v laboratoři Bratislava 5,4 %.

Pokud porovnáme výsledky získané metodou PCR a kultivační metodou v Nemocnici České Budějovice, a.s. a Oblastní nemocnici Kladno, a.s. zjistíme, že opět výrazně převyšuje pozitivita *Ureaplasma urealyticum*. Pozitivita *Ureaplasma urealyticum* dosahovala v Nemocnici České Budějovice 23 % a v Oblastní nemocnici Kladno, a.s. 35,5 %.

Pozitivita na *Mycoplasma hominis* dosahovala v Nemocnici České Budějovice, a.s. 14 %, zatímco v Oblastní nemocnici Kladno, a.s. 1,8 %. Lze tedy konstatovat, že použití metody PCR při detekci positivity je mnohem citlivější.

Při porovnání výsledků Nemocnice České Budějovice, a.s. (metoda PCR), Centrální laboratoře v Bratislavě a Oblastní nemocnice Kladno, a.s. (metoda kultivační) jsme zjistili, že *Ureaplasma urealyticum* dosahuje převahy, a to v 33,7 %, *Mycoplasma hominis* dosahovala 3,6 %. Oproti tomu výsledky z Nemocnice České Budějovice, a.s. uvádějí pozitivitu *Ureaplasma urealyticum* 23 % a pozitivitu na *Mycoplasma hominis* 14 %. I zde je patrné, že metoda PCR je mnohem citlivější. Tato metoda je citlivější z toho důvodu, že při ní můžeme detekovat už velmi malé množství, někdy i jednu sekvenci vzorku. Zatímco u ostatních metod, tedy i metody kultivační, je zapotřebí k detekci materiálu mnohem více.

Z porovnaných výsledků je jasně zřetelné, že převyšuje pozitivita *Ureaplasma urealyticum*.

Závěr

Mycoplasma hominis a *Ureaplasma urealyticum* jsou mikroorganismy, které jsou normální součástí mikroflóry urogenitálního systému zdravého jedince. U pacientů s některými urogenitálními a gynekologickými onemocněními jsou izolovány ve větším počtu. Míra patogenity u těchto mikroorganismů není ještě stále přesně objasněna.

Mollicutes tvoří unikátní skupinu mikroorganismů. Představují nejmenší známý organismus, který je schopný samostatného života. Od ostatních bakterií se liší svými specifickými vlastnostmi, hlavně tím, že netvoří peptidoglykan, který je důležitý pro tvorbu buněčné stěny. Jejich detekce také není jednoduchá. Mollicutes tvoří malé kolonie od 0,01 – 0,6 mm. Vzorky *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* můžeme odebírat z uretry, moči, ejakulátu, dále pak z kloubních tekutin, amniové tekutiny, tracheálním aspirátu novorozenců a z krve. Jejich kultivace se provádí buď na pevných, nebo tekutých půdách, kde zpravidla rostou lépe.

Abychom dobře detekovali *mycoplasma* a *ureaplasma*, používáme nejrůznější metody. Mezi sérologickou typizací patří test ELISA, imunofluorescenční test a růstově inhibiční test. Pro detekci velmi špatně kultivovatelných mikroorganismů se využívají metody molekulárně biologické. Sem patří hlavně metoda polymerázové řetězové reakce a metoda polymerázové řetězové reakce v reálném čase.

Bakalářské práce byla rozdělena do tří částí. V první části byla shromážděna odborná literatura k tématu práce včetně internetových zdrojů. Tyto zdroje jsou citovány v teoretické části práce a uvedeny v seznamu použité literatury.

Další částí práce bylo ovládnutí laboratorní techniky vyšetřovaných kmenů Mollicutes z urologického biologického materiálu. Vlastní analýza byla provedena v Nemocnici v Českých Budějovicích a. s., v laboratoři molekulární biologie a genetiky, kde pro izolaci DNA byla použita metoda ruční izolace DNA a metoda izolace DNA pomocí izolátoru. Jako vyšetřovaný materiál byla použita moč. Tento materiál byl použit z toho důvodu, že je oproti stěrům jednodušší a příjemnější odebrání pro pacienta. Vzorky ze stěrů použity nebyly z toho důvodu, že takto odebraných vzorků je již velmi málo a za mého působení na pracovišti žádný takový vzorek do laboratoře doručen nebyl. V teoretické části práce je však uvedeno, jak se s těmito vzorky pracuje.

V současné době se laboratorní vyšetření provádí již běžně pomocí komerčně dodávané sady. Osobně jsem si vyzkoušela laboratorní vyšetření pomocí metody polymerázové řetězové reakce, která se provádí jak pomocí analyzátoru, tak také ručně.

Také uvádím celkové výsledky výzkumů z České a Slovenské republiky a následně tyto výzkumy porovnávám. Pro srovnání jsem využila sebraný materiál z mikrobiologického oddělení Oblastní nemocnice Kladno, a.s. za období jeden rok a publikované výsledky Centrální laboratoře v Bratislavě, která uvedla výsledky svých vyšetření za dobu 4 let.

Výsledky šetření jednoznačně poukázaly na to, že kmen *Ureaplasma urealyticum* se vyskytuje mnohem častěji než kmen *Mycoplasma hominis*, a to jak v Česku, tak i na Slovensku. *Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* můžeme běžně najít jako součást mikroflóry urogenitálního systému.

V závěrečné interpretaci výsledků a v diskuzi uvádím, že převažuje pozitivita na *Ureaplasma urealyticum*.

Seznam použité literatury

1. AINSWORTH, J. G., CLARKE, J., GOLDING., TAYLOR-ROBINSON, D., 2000. Disseminated Mycoplasma Fermentans in AIDS patients: several case reports. Int. J. STD AIDS, 11:751–755. Online ISSN: 1758-1052
2. Anyplex™ II – STI-7 Detection (V1.1). Kat. č. SD7700Y. (laboratorní příručka)
3. BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK M., 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada,. 164 s. ISBN 978-80-247-3533-7.
4. BAYRAKTAR, M.R., OZEROL, I. H., GUCLUER, N., CELIK, O., 2010. International Journal of Infectious Diseases. *Prevalence and antibiotic susceptibility of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in pregnant women*. Int. J. Infect. Dis., 14 (2), 90–95, doi: 10.1016/j.ijid. 2009.03.020.
5. BEDNÁŘ, M., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil. 321 s. ISBN 80-238-0297-6
6. BOUCHALOVÁ, K., HAJDÚCH, M., 2016. *Prediktivní a prognostická onkologie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. 85 s. ISBN 978-80-244-3188-8.
7. CIMOLAI, N., 2001. *Laboratory diagnosis of bacterial infections*. New York: Marcel Dekker. 886 p. ISBN 08-2470-589-0.
8. DEGUCHI, T., YOSHIDA, T., MIYAZAWA, T. et al. 2004. Journal of Clinical Microbiology. *Assotiation of Urea plazmaurealyticum (biovar 2) with nongonococcal urethritis*. 31 (3): 192–195.
9. DIENES, L., EDSALL, G., 1937. Experimental Biology and Medicine. *Observations on the L-organism of Klieneberger*. 36:740–744. Publish Year: 2012, doi: 10.3181/00379727-36-9380
10. DIENES, L., EDSALL, G., 1937. Experimental Biology and Medicine. *Observation on the L-organism of Klineberger*. 36:740-744. doi: 10.3181/00379727-36-9380
11. DOLEŽAL, A., 2007. *Porodnické operace*. Praha: Grada. 376 s. ISBN 978-80-247-0881-2.

12. DORT, J., DORTOVÁ, E., JEHLIČKA, P., 2013. *Neonatologie*. Praha: Karolinum. 101 s. ISBN 978-80-246-2253-8.
13. DVOŘÁKOVÁ, K., 2009. Klinická farmakologie a farmacie. *Nejčastější sexuálně přenosné infekce a možnosti jejich léčby*. 23(1), 24-29. ISSN 1212-7973.
14. FREUNDT, E. A. *The classification of the pleuropneumonia-like group of organisms (Borrelomycetales)*. International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy, 1995, 5, s. 67-78. Online ISSN 1465-2102.
15. GDOURA, R., KCHAOU, W., CHAARI, CH., ZNAZEN, A., KESKES, L., REBAI, T., HAMMAMI, A., 2007. NCBI BMC Infectious Diseases. *Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium infections and semen quality of infertile men*. 7, 1–9, doi: 10.1168/1471-2334-7-129.
16. GROSS, G., TYRING, S. K., 2011. *Sexually transmitted infections and sexually transmitted diseases*. Springer. 3-11 p. ISBN 978-3-642-14662-6.
17. JENSEN, L. T. et al., 1995. Infection and immunity. *Selection of Mycoplasma hominis PG21 deletion mutants by cultivation in presence of monoclonal antibody 552*. vol. 63, no. 9, 3336-3347 p. ISSN: 0019-9567.
18. KLABAN, V., 2005. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha: Galén. 654 s. ISBN 80-7262-341-9.
19. KOLOMBO, I., et al., 2004. *Problémy současných STD v naší urologické praxi*. 129-130. Urologie pro praxi. Turnov. ISSN 1803-5299.
20. KRŠKA, Z., 2011. *Techniky a technologie v chirurgických oborech: vybrané kapitoly*. Praha: Grada. 29 s. ISBN 978-80-247-3815-4.
21. LUKÁŠ, K., ŽÁK, A., 2014. *Chorobné znaky a příznaky: diferenciální diagnostika*. Praha: Grada. 890 s. ISBN 978-80-247-5067-5.
22. MAREK, J., 2010. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 4., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. 743 s. ISBN 978-80-247-2639-7.

23. MAŠATA, J., JEDLIČKOVÁ, A., ŠVIHOVEC P., 2008. Klinická farmakologie. *Antibiotická léčba a profylaxe některých infekcí v těhotenství*. 22 (4), 137–141. ISSN 1803–5353 (online).
24. MUNTAU, A., 2009. *Pediatric*. Praha: Grada. 170 s. ISBN 978-80-247-2525-3.
25. MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K., PFALLER, M. A., 2005. *Medical microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby 61: 10-15 p. ISBN 03-230-3303-2.
26. NAVRÁTIL, L., 2008. *Vnitřní lékařství: pro nelékařské zdravotnické obory*. Praha: Grada. 424 s. ISBN 978-80-247-2319-8.
27. OLSON, L.D. et al., 1991. Journal list. *Monoclonal antibodies to surface antigens of a pathogenic Mycoplasma hominis strain*. *Infection and immunity*. 59(5), 1683-1689, ISSN: 0019-9567.
28. PARKER, M. T., DUERDEN, B. J., 1993. *Systematic bacteriology*. Philadelphia: B. C. Decker. 709 s. ISBN 1-55664-290-3.
29. PEUTHERER, J. F., Richard C. B. SLACK, R. C. B., GREENWOOD, D., 1999. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada. ISBN 80-716-9365-0.
30. QUINN, P. J., CARTER, M. E., MARKEY, B. K., CARTER, G. R., 1994. *Clinical veterinary microbiology*. Wolfe Publishing. 684 p. ISBN 0-7234-1711-3.
31. RAZIN, S., 1981. Israel journal of medicine science. *Mycoplasmas: the smallest pathogenic prokaryotes*. 17(7), 510-515. ISSN: 0021-2180.
32. ROTTEM, S., 2003. Physiological reviews. *Interaction of Mycoplasmas With Host Cells*. 83(2), 417-432. ISSN 1522-1210.
33. ROZTOČIL, A., BARTOŠ, P., 2011. *Moderní gynekologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2832-2.
34. SHEPARD, M. C., 1954. Am. J. Syph. Gonorr. Vener Dis. *The recovery of pleuropneumonia-like organisms from Negro men with and without nongonococcal urethritis*. 38 (2), 113–124.

35. SCHINDLER, J., 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada. 110 s. ISBN 978-80-247-4771-2.
36. SLEZÁKOVÁ, L., ANDRÉSOVÁ, M., KADUCHOVÁ, P., ROUČOVÁ, M., STAROŠTÍKOVÁ, E., 2017. *Ošetřovatelství v gynekologii a porodnictví*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing. 45 s. ISBN 978-80-271-0214-3.
37. STÜLKE, J., EILERS, H., SCHMIDL, R. S., 2009. The desk Encyclopedia of Microbiology. *Mycoplasma and Spiroplasma*. Amsterdam: Academic. 1259 s. ISBN 978-0-12-374980-2.
38. ŠPAČEK, J., BUCHTA, V., JÍLEK, P., 2013. *Vulvovaginální dyskomfort a poruchy poševního prostředí*. Praha: Grada. 40 s. ISBN 978-80-247-4554-1.
39. ŠTORK, J., 2008. *Dermatovenerologie*. Praha: Galén. 502 s. ISBN 978-80-7262-371-6.
40. TAKASHI D, SCHIN-ICHI M., 2002. J Urol. *Mycoplasma genitalium: Another important pathogen of nongonococcal urethritis*. 167(3), 1210–1217.
41. TAYLOR-ROBINSON, D., 1993. In Systematic bacteriology. *The Mycoplazmatales*. Philadelphia, Pennsylvania: B.C. Decker Inc. 664-681 s. ISBN 1-55664-290-3.
42. TAYLOR-ROBINSON, D., 1999. Lékařská mikrobiologie. *Mykoplazmata*. 1. vyd. Praha: Grada. Kapitola 42, 389-398 s. ISBN 80-7169-365-0.
43. TEPLAN, V., 2004. *Infekce ledvin a močových cest: v dospělém a dětském věku*. Praha: Grada. 16 s. ISBN 80-247-0566-4.
44. VAŘEJKA, F., MRÁZ, O., SMOLA, J., 1989. *Speciální veterinární mikrobiologie: celost. vysokošk. učebnice pro vys. školy veterinární*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. ISBN 80-209-0042-x.
45. VOSMÍK, F., 1999. *Dermatovenerologie*. Praha: Karolinum. 396 s. ISBN 80-7184-633-3.

46. VOTAVA, M., 2000. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. Brno: Hortus. 495 s. ISBN 80-238-5058-X.

47. VOTAVA, M., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. 408 s. ISBN 80-902896-6-5.

48. WAITES, K. B., SCHELONKA, B., 2005. *Clinical microbiology reviews*. Mycoplasma and Ureaplasmas as neonatal pathogens. 18(4), 757-789. doi: 10.1128/CMR.18.4.757-789.2005

49. ZHANG, Q., WISE, K.S., 1996. Infection and immunity. *Molecular basis of size and antigenic variation of Mycoplasma hominis adhesin encoded by divergent vaa genes*. 64(7). 2737-2744. ISBN: 0019-9567.

Internetové odkazy

50. Biosynex® *Mycoplasma Test*. Příbalový leták, © 2019 [online]. [cit. 2019-3-16]. Dostupné z: <http://www.gali.cz/>

51. *Fakulta veterinárního lékařství*, © 2016 [online]. [cit. 2018-3-12]. Dostupné z: <https://fv1.vfu.cz/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/infekcni-choroby/pedagogicka-cinnost/mikrobiologie/mykoplazmata.pdf>

52. HAVLÍK, J., 2010. *Makrolidová antibiotika a jejich využití v ambulantní péči*. *Medicina pro praxi*. 7 (10). 365-367. [online] [cit. 2018-3-31]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2010/08/04.pdf>

53. HLAVÁČOVÁ, J., © 2012. *Mikrobiální původci alimentárních onemocnění a civilizační choroby*. [online]. Mendelova univerzita Brno. [cit. 31. 3. 2018]. Dostupné z: https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty/files/23/23_mikrobialni_puvodci_alimentarni_ch_onemocneni_a_civilizacni_choroby.pdf

54. JURAJDA, V., 2003 *Nemoci drůbeže a ptactva – bakteriální a mykotické infekce*. 1. vyd. Brno: ES VFU Brno. 185 s. [online]. [cit. 2018-3-12]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Mollicutes>

55. KONEČNÁ, J., 2010. *Diagnostika Ureaplasma urealyticum a Mycoplasma hominis ve FN Brno* [online]. Brno, [cit. 2017-12-30]. Dostupné z: <http://is.muni.cz/th/258286/lf_b/>. Bakalářská práce.

56. KRUŽLÍKOVÁ, A., KUNOVÁ, A., 2016. *Urogenitální infekce vyvolané mykoplazmami a ureaplazmami*. Alpha medical Urologia. [online] [cit. 2018-3-31]. Dostupné z: <https://www.alphamedical.sk/casopis-invitro/urogenitalne-infekcie-vyvolane-mycoplazmami-ureaplazmami>
57. *Morfologie T. Pallidum.*, © 2017 [online] [cit. 2018-3-12]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/4868079/>.
58. *Mycoplasma a ureoplasma.*, © 2013. Chlamydie. info. [online]. [cit. 2018-3-31]. Dostupné z: <http://www.chlamydie.info/content/mycoplasma-ureoplasma>
59. *Mykoplazmové infekce*, © 2011. Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK. Úvod [online]. [2017-12-30]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/?q=mykoplazmove-infekce>
60. *Mykoplazmová infekce, mykoplazmata - příznaky, projevy, symptomy*, © 2009. [online]. [cit. 2017-12-30]. Dostupné z: <http://www.priznaky-projevy.cz/infekcni-nemoci/mykoplazmova-infekce-mycoplazmata-priznaky-projevy-symptomy>
61. *Mykoplazmová infekce. Pohlavní nemoci*, © 2016 [online]. [cit. 2017-12-30]. Dostupné z: <http://www.pohlavni-nemoci-a-jejich-priznaky.cz/mykoplazmova-infekce>
62. *Mykoplazmata 301 Moved Permanently.*, © 2001. 301 Moved Permanently [online]. [cit. 2018-3-12]. Dostupné z: <http://www.docplayer.cz/20930861-Mykoplazmata-1-mycoplazmata.html>
63. *Největší informační zdroj pro lékaře - proLékaře.cz*, © 2009 [online]. [cit. 2018-2-23]. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/pdf?ida=pg_06_03_05.pdf
64. [online]. © 2011. [2017-12-30]. Dostupné z: <http://www.zdravi.euro.cz/clanek/priloha-pacientske-listy/gynekologicke-zanety-453769>
65. ROBERTSON, A. STEMKE, G.W., 2001. *Kurzinformation zu Analysen* [online]. [cit. 2018-2-23]. Dostupné z: <http://www.lg1.ch/textinhalte/analysen/konsilien/konsilium.lasso?-keyvalue=2167>

66. ŠTEFÁNEK J., © 2014 *Mykoplazmové infekce*. Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK. [online] [cit. 2018-3-31]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/?q=mykoplazmove-infekce>

67. *Venerologie*, © 2011. VENEROLOGIE | Vyšetření a léčba pohlavně přenosných onemocnění [online]. [cit. 2018-3-12]. 502 s. Dostupné z: <http://www.venerologie.cz/onemocneni/mycoplasma-hominis/>

68. VILIMOVSKÁ, K. 2016. Sexuálně přenosné infekce 2. část: bakteriální původci, jiní než *Chlamydia trachomatis*. *Synlabianer odborný časopis pro lékaře*. 16(3), 16-21. [online 2018-11-18]. Dostupné z: http://www.synlabianer.cz/clanky/sexualne-prenosne-infekce-2-cast-bakterialni-puvodci-jini-nez-chlamydia-trachomatis_7