

Wykrywanie mykoplazm urogenitalnych w próbkach klinicznych

STRESZCZENIE

Mykoplazmy urogenitalne to przedstawiciele rodzajów *Mycoplasma* i *Ureaplasma*, które są mikroorganizmami uznawanymi zarówno za komensalne, jak i patogenne. Złotym standardem wykrywania ich w próbkach klinicznych jest hodowla i identyfikacja w oparciu o testy biochemiczne. Metoda ta jest jednak czasochłonna i mało specyficzna. Detekcja mykoplazm z wykorzystaniem PCR pozwala na przyporządkowanie nie tylko do rodzaju, ale także do gatunku. W tej pracy analizie poddano 100 próbek klinicznych w celu identyfikacji *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. parvum* i *U. urealyticum*, z wykorzystaniem zarówno metod biochemicznych, jak i molekularnych. Przedstawione wyniki potwierdzają małą specyficzność testów biochemicznych oraz większą skuteczność detekcji poszczególnych gatunków z wykorzystaniem metod molekularnych.

WSTĘP

Mikroorganizmy określane jako mykoplazmy to eubakterie klasy *Mollicutes* (rodzina *Mycoplasmataceae*, rodzaj *Mycoplasma* i *Ureaplasma*), najmniejsze znane samoreplikujące się organizmy. Wykazują one charakterystyczne cechy, takie jak brak ściany komórkowej, rozmiar komórek w granicach 0,3–0,8 μm oraz niewielki genom (0,58–2,20 Mb) [1,2]. Jak dotąd zidentyfikowano ok. 200 gatunków mykoplazm, z których 17 związanych jest z człowiekiem. Kolonizują one głównie błony śluzowe dróg oddechowych i moczopłciowych [3]. Dwa gatunki z rodzaju *Mycoplasma* – *M. hominis* i *M. genitalium* oraz dwa z rodzaju *Ureaplasma* – *U. parvum* i *U. urealyticum* wchodzą w skład mikrobioty pochwy i nazywane są mykoplazmami genitalnymi (lub urogenitalnymi). Ich obecność w biocenozie pochwy zależy od wieku, poziomu hormonów, aktywności seksualnej i ciąży [4]. Mykoplazmy genitalne są organizmami komensalnymi, jednak mogą odgrywać ważną rolę w patologii układu moczopłciowego. Najczęściej właściwości chorobotwórcze przypisuje się *Mycoplasma hominis* i *Ureaplasma urealyticum*, pojawia się jednak coraz więcej doniesień na temat chorobotwórczości *M. genitalium*, a i rola *U. parvum* nie jest do końca jasna. Wiele wskazuje, że mykoplazmy urogenitalne związane są z przypadkami nieswoistych zapaleń dróg moczopłciowych tj. nierzęzączkowe zapalenie cewki moczowej (NGU). Bakterie te mogą być także przyczyną powikłań, takich jak poronienie czy przedwczesny poród, ale również problemy z płodnością. Możliwe jest także zakażenie na drodze wertykalnej, co prowadzi do infekcji dolnych dróg oddechowych lub zespołów zaburzeń oddechowych u noworodków [5,6].

Narządy rodne kobiet znacznie częściej skolonizowane są przez *Ureaplasma* spp. w porównaniu do gatunków z rodzaju *Mycoplasma*. Dane epidemiologiczne wskazują, że blisko 90% aktywnych seksualnie zdrowych kobiet jest nosicielkami ureaplazm, natomiast *M. hominis* występuje u 20–50%, a *M. genitalium* u zaledwie 5%. Jednoczesna kolonizacja więcej niż jednym gatunkiem mykoplazm jest również powszechna [7–13].

Potwierdzenie obecności mykoplazm urogenitalnych w próbkach klinicznych wymaga badań laboratoryjnych. Atypowa budowa komórkowa mykoplazm czyni je jednak trudnymi nie tylko w wykrywaniu, ale także w identyfikacji. Niewielkie rozmiary komórki i brak ściany komórkowej uniemożliwia bezpośrednią diagnostykę z materiału klinicznego, poprzez np. wykonanie preparatu barwionego metodą Grama. Techniki hodowlane wymagają zaś podłoża selektywnych oraz inkubacji w warunkach mikroaerofilnych [14]. Kliniczne testy diagnostyczne stosowane rutynowo, oparte na charakterystyce biochemicznej, wykorzystują reakcje kolorymetryczne. Umożliwiają one wykrywanie mykoplazm w próbce badanej oraz jednoczesne określenie ich lekowrażliwości. Ta ostatnia cecha jest szczególnie istotna ze względu na szeroką oporność naturalną tych drobnoustrojów np. wobec antybiotyków

dr Sylwia Andrzejczak-Grządko¹✉,

mgr Izabela Dolińska²

¹Katedra Mikrobiologii i Genetyki, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski

²Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Szpital Uniwersytecki im. K. Marcinkowskiego w Zielonej Górze

https://doi.org/10.18388/pb.2019_273

✉ autor korespondujący: s.andrzejczak-grzadko@wnb.uz.zgora.pl

Słowa kluczowe: *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. parvum*, *U. urealyticum*, PCR, *Mycoplasma* IST2

Skróty: AZI – azytromycyna; CIP – ciprofloksacyna; CLA – klarytromycyna; DOT – doksycyklina; ERY – erytromycyna, JOS – josamycyna; OFL – ofloksacyna; Mh – *Mycoplasma hominis*; PRI – pristinamycyna; TET – tetracyklina; Uu – *Ureaplasma* spp.;

Podziękowania: Badania te były częściowo wspierane przez Wojewódzki Fundusz Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej w Zielonej Górze.

beta-laktamowych. Gotowe zestawy do identyfikacji mykoplazm koncentrują się na *M. hominis* i *Ureaplasma* spp. W związku z tym inne patogenne gatunki mykoplazm, np. *M. genitalium*, nie są wykrywane w standardowych testach i wymagają odrębnych metod diagnostycznych [15].

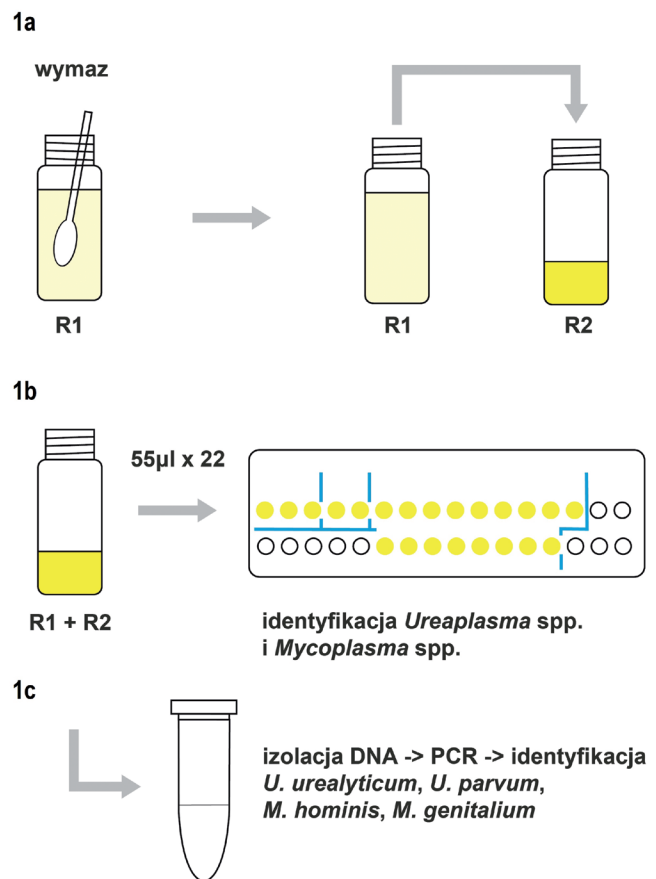
Diagnostyka molekularna, oparta o techniki PCR, jest istotną alternatywą dla testów biochemicznych, ze względu na możliwość identyfikacji poszczególnych gatunków mykoplazm. Literatura dostarcza informacji na temat różnych starterów, które są konstruowane w celu identyfikacji tych drobnoustrojów. Primery te koncentrują się na różnych celach molekularnych w genomie *Mycoplasma* spp. Niestety jak dotąd nie ustalono jednej czułej i swoistej metody identyfikacji poszczególnych gatunków w obrębie tej rodziny. Pewna detekcja poszczególnych gatunków *Mycoplasma* spp. i *Ureaplasma* spp. jest istotna przede wszystkim ze względu na ciągle niejasną rolę mykoplazm w patogenezie chorób układu moczowo-płciowego [16,17].

W Polsce wykrywanie mykoplazm urogenitalnych nie jest częścią rutynowej procedury diagnostycznej. W związku z tym niewiele wiadomo na temat stopnia nosicielstwa tych bakterii w polskiej populacji. W ostatnim czasie w Klinice Położnictwa i Ginekologii Szpitala Uniwersyteckiego w Zielonej Górze wprowadzono rutynowe badanie w kierunku obecności mykoplazm w wymazach z pochwy wszystkich pacjentek przyjmowanych na oddział. Diagnostyka opiera się o testy komercyjne identyfikujące dwa najpowszechniejsze gatunki mykoplazm. W związku z doniesieniami wskazującymi na różnice w wykrywaniu *Mycoplasma* spp. i *Ureaplasma* spp. gdy stosuje się metody hodowli i PCR [18-20], podjęto próbę porównania wydajności metody opartej na hodowli w stosunku do identyfikacji mykoplazm urogenitalnych w próbkach klinicznych metodami molekularnymi.

MATERIAŁY I METODY

Analizie poddano 407 wymazów z pochwy, pobieranych rutynowo od pacjentek hospitalizowanych w Szpitalu Uniwersyteckim im. K. Marcinkiewicza w Zielonej Górze. Pobór prób odbywa się zawsze według ustalonych i ujednoliconych zasad, minimalizujących ewentualne błędy diagnostyczne.

W pierwszym etapie obecność mykoplazm urogenitalnych potwierdzano w laboratorium diagnostycznym Szpitala Uniwersyteckiego w Zielonej Górze. Test diagnostyczny przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Mycoplasma IST2 (bioMerieux), który identyfikuje *Mycoplasma hominis* i *Ureaplasma* spp. oraz umożliwia określenie przybliżonej ich liczby ($>10^4$). Test dodatkowo ocenia lekowrażliwość izolatu wobec 9 antybiotyków/ chemioterapeutyków. Mycoplasma IST2 przeprowadza się na pasku diagnostycznym ze studzienkami. W pożywce obecna jest arginina do hodowli mykoplazm i mocznik do hodowli ureaplazm oraz czerwien fenolowa jako wskaźnik zmiany pH.



Rycina 1. Procedura wykrywania mykoplazm urogenitalnych z wykorzystaniem Mycoplasma IST 2.

Próbki kliniczne inokulowano do podłoża transportowego R1 zgodnie z instrukcjami producenta (Ryc. 1a), następnie przesiewano do zliofilizowanego podłoża wzrostowego R2 i otrzymaną zawiesinę przenoszono do studzienek na pasku diagnostycznym (Ryc. 1b). Próbkę (pasek i pozostałość podłoża R1+R2) inkubowano w temperaturze 37°C i obserwowano zmiany barwy, spowodowane alkalizacją pożywki, od żółtego do czerwonego, po 24 i 48 godzinach inkubacji. Obecność *M. hominis* i *Ureaplasma* spp. rozpoznawano na podstawie zmiany barwy podłoża w odpowiednich studzienkach (interpretacja wyniku – tabela 1 i 2). W tym etapie zebrano 100 próbek pozytywnych.

Próby dodatnie w teście Mycoplasma IST2 (100 µl hodowli w podłożu R1+R2 w trzech powtórzeniach) przesiewano na podłożo stałe A7 Mycoplasma Agar (bioMerieux) i inkubowano w 37°C w warunkach mikroaerofil-

Tabela 1. Odczyt i interpretacja wyników hodowli w podłożu płynnym R1+R2.

Wynik ujemny		Wynik dodatni (<i>Ureaplasma</i> spp. i/lub <i>Mycoplasma hominis</i>)
Barwa bulionu	żółta	pomarańczowa do czerwonej <i>Ureaplasma</i> spp. – bulion klarowny <i>M. hominis</i> – możliwe słabe zmętnienie bulionu

Tabela 2. Odczyt i interpretacja wyników hodowli na pasku *Mycoplasma* IST2.

Studzienka	Identyfikacja		Uu >10 ⁴	Mh >10 ⁴	Antybiogram (mg/l)						
	kontrola	Uu Mh			DOT	JOS	OFL	ERY	TET	CIP	AZI
Odczyt dodatni	barwa pomarańczowa do czerwonej			barwa czerwona	barwa pomarańczowa do czerwonej						
Odczyt ujemny	barwa żółta			barwa żółta do pomarańczowej	barwa żółta						

Tabela 3. Startery stosowane do wykrywania *M. hominis*, *M. genitalium* *U. parvum* i *U. urealyticum* metodą PCR.

Specyficzność	Starter	Cel/ sekwencja	Wielkość ampliconu (pz)	Ref.
<i>Mycoplasma</i> spp.	GSO MGSO	16S rRNA GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT TGCACCATCTGTCACCTCIGTAAACCTC	163	21
<i>Ureaplasma</i> spp.	UuF5' UuR5'	16S rRNA TGGAGTTAAGTCGTAACAAG CTGAGATGTTTCACTTCACC	559	22
<i>M. hominis</i>	RNA H1 RNA H2	16S rRNA CAATGGCTAATGCCGGATACGC GGTACCGTCAGTCTGCAAT	344	23
<i>M. genitalium</i>	MgPa-1 MgPa-2	Gen adhezyny AGTTGATGAAAACCTTAACCCCTTGG GACCATCAAGGTATTCTCAACAGC	282	24
<i>U. parvum</i>	UP063#1F UP063#1R	Gen białka UP063 TGC GG TGT TGT GAACT TGATCAAAC T GATATCGCAATTATAGA	152	25
<i>U. urealyticum</i>	UU127#1F UU127#1R	Gen białka UU127 GGATTGTTAGATATCGTCAAGG TCATCTTTTAAAGCTCCACATTATTAGT	152	25

nych. Wzrost kolonii oceniano mikroskopowo po 3 i 5 dniach inkubacji.

W dalszej części badań, wszystkie próbki *Mycoplasma* IST2-pozytywne poddawane były analizie molekularnej, w oparciu o konwencjonalny PCR (Ryc. 1c). Izolację DNA z osadu hodowli bulionowej R1+R2 *Mycoplasma* IST2 przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega) zgodnie z instrukcjami producenta. Badania molekularne wykonano w dwóch etapach. W pierwszej kolejności w próbkach zidentyfikowano rodzaje *Mycoplasma* i *Ureaplasma* wykorzystując startery celujące w sekwencji 16S rRNA. Następnie próbki z pozytywnymi wynikami dla rodzaju *Ureaplasma* analizowano pod kątem obecności *U. urealyticum* i *U. parvum*, a te pozytywne dla rodzaju *Mycoplasma* pod kątem obecności *M. hominis* i *M. genitalium*. Listę wykorzystanych starterów przedstawiono w tabeli 3. Skład reakcji PCR oraz warunki amplifikacji stosowano zgodnie z danymi literaturowymi [21-25]. Produkty PCR poddano elektroforezie w 2% żelu agarozowym i zidentyfikowano na podstawie wielkości prążka (na podstawie danych literaturowych – tabela 3).

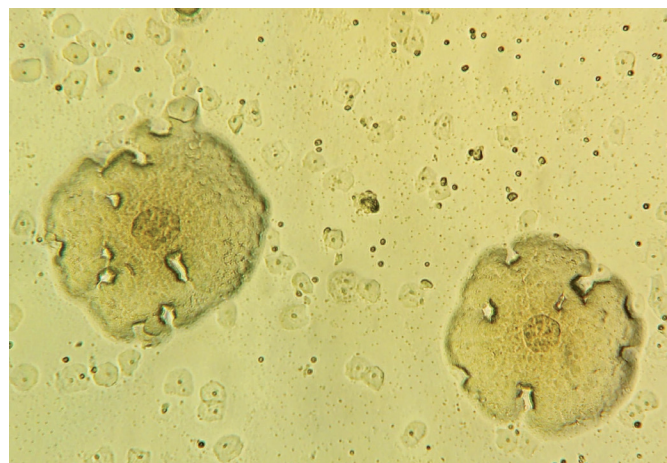
Wszystkie procedury przeprowadzone w tym badaniu były zgodne ze standardami etycznymi. Badanie to zostało zatwierdzone przez komisję bioetyki przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Zielonej Górze (No. 22/104/2018).

WYNIKI

W pierwszym etapie pracy potwierdzono obecność mykoplazm urogenitalnych w 100 próbkach klinicznych

z wykorzystaniem zestawu *Mycoplasma* IST2, co stanowi 24,6%. W teście tym, we wszystkich analizowanych próbkach, oznaczono jedynie *Ureaplasma* spp. Interpretacja wyniku hodowli IST2 potwierdziła obecność ureoplazm w próbkach w ilości >10⁴.

Hodowla na agarze A7 była pozytywna dla 26 próbek. W przypadku 5 hodowli wyniku nie można było zinterpretować, ze względu na obecność zanieczyszczeń i wzrost innych drobnoustrojów. Na podstawie charakterystycznej morfologii kolonii przypominającej „sadzone jajka” dla *Mycoplasma* spp. (Fot. 1) lub „jeżowce” dla *Ureaplasma* spp. zidentyfikowano odpowiednio 20 i 6 izolatów.



Fotografia 1. *Mycoplasma* spp. izolowana na agarze A7.

Tabela 4. Porównaniu wyników hodowli i wyników PCR badanych prób.

Gatunek	IST2	A7	PCR
<i>U. urealyticum</i>	-	-	41
<i>U. parvum</i>	-	-	90
<i>Ureaplasma</i> spp.	100	20	100
<i>M. hominis</i>	0	-	49
<i>M. genitalium</i>	-	-	0
<i>Mycoplasma</i> spp.	-	6	99

W drugim etapie oceniano obecność mykoplazm urogenitalnych w badanych próbkach z wykorzystaniem konwencjonalnej reakcji PCR. Amplifikacja potwierdziła obecność rodzaju *Ureaplasma* we wszystkich próbach oraz rodzaju *Mycoplasma* w 99/100 próbach. Analiza szczegółowa z wykorzystaniem starterów specyficznych dla gatunku potwierdziła obecność *U. urealyticum* w 41/100 próbach (41%) oraz *U. parvum* w 90/100 próbach (90%). *M. hominis* stwierdzono w 49/99 próbach (49,5%). W pozostałych 50 próbach PCR-pozytywnych dla rodzaju *Mycoplasma* nie zidentyfikowano gatunku. Wyniki podsumowano w tabeli 4. Współwystępowanie dwóch lub trzech różnych gatunków mykoplazm urogenitalnych wykazano w większości (99/100) próbek (Tab. 5).

Tabela 5. Współwystępowanie mykoplazm urogenitalnych w badanych próbach.

Gatunek	Liczba (%)
<i>U. parvum</i>	1 (1%)
<i>U. parvum</i> + <i>M. hominis</i>	24 (24%)
<i>U. urealyticum</i> + <i>M. hominis</i>	5 (5%)
<i>U. parvum</i> + <i>Mycoplasma</i> spp.	33 (33%)
<i>U. urealyticum</i> + <i>Mycoplasma</i> spp.	5 (5%)
<i>U. parvum</i> + <i>U. urealyticum</i> + <i>M. hominis</i>	20 (20%)
<i>U. parvum</i> + <i>U. urealyticum</i> + <i>Mycoplasma</i> spp.	12 (12%)
Łącznie	100 (100%)

Porównanie wyników testu biochemicznego z wykorzystaniem zestawu *Mycoplasma* IST2, hodowli na agarze A7 oraz testu molekularnego PCR wskazuje na ich niezgodność. Zestaw komercyjny IST2 wykazał obecność w analizowanych próbach jedynie *Ureaplasma* spp., nie potwierdził natomiast obecności *Mycoplasma* spp. Hodowla na podłożu stałym A7 potwierdziła obecność obu rodzajów zidentyfikowanych drobnoustrojów, jednak ze znacznie niższą czułością. Badania molekularne potwierdziły obecność rodzaju *Mycoplasma* w analizowanym materiale (99/100), przy czym obecność gatunku *M. hominis* potwierdzono w prawie połowie próbek (49,5%).

DYSKUSJA

Według danych literaturowych występowanie mykoplazm urogenitalnych zależy od wielu czynników tj. wiek, aktywność seksualna, poziom hormonów czy ciąży. Dlatego też rozkład stopnia nosicielstwa waha się w du-

żym zakresie, w zależności od grupy badanej [26,27]. Nasze wyniki, dotyczące kolonizacji *Ureaplasma* spp. 24,6% badanych kobiet, są zgodne z niektórymi autorami, którzy wykazali podobny procent kolonizacji [28-30] oraz wynikami nielicznych badań prowadzonych w Polsce, które pokazują 29,8% przypadków *Ureaplasma* spp. u kobiet nie będących w ciąży z infekcją układu moczopłciowego oraz 26,3% w przypadku kobiet w ciąży [31-32]. Z drugiej jednak strony jest wiele doniesień wykazujących poziom nosicielstwa rzędu 40-70% [33-36]. Tak duże rozbieżności danych potwierdzają, że na wynik analizy wpływ ma przede wszystkim wybór grupy badanej. Dane literaturowe, również te z Polski, dotyczące *Mycoplasma* spp., głównie *M. hominis*, mówią o stopniu kolonizacji na poziomie 7-27% [37-40]. Pokrywa się to z naszymi wynikami, jednakże w większości naszych próbek (99%) wykazaliśmy współwystępowanie *Mycoplasma* spp. z *Ureaplasma* spp., co jest zjawiskiem powszechnym i już opisywanym w literaturze [41-44], jednak jak dotąd nie odnotowano tak wysokiego stopnia koinfekcji.

Bezpośrednia detekcja mykoplazm urogenitalnych w próbkach klinicznych jest niemożliwa, ze względu na ich właściwości tj. małe rozmiary i brak ściany komórkowej. Za złoty standard w ich wykrywaniu uznawana jest ciągła hodowla, jednak analiza DNA pozwala na identyfikację poszczególnych gatunków mykoplazm [45].

Przeprowadzone badania wykazały, że wyniki detekcji mykoplazm urogenitalnych z wykorzystaniem zestawu *Mycoplasma* IST2 (markery biochemiczne), hodowli na agarze A7 oraz PCR (stosując startery specyficzne dla gatunków z rodzaju *Mycoplasma* i *Ureaplasma*) są niezgodne. Hodowla w podłożu płynnym zestawu IST2 i na podłożu stałym, okazuje się mniej czuła i mało specyficzna. Komercyjny zestaw stosowany w szpitalnym laboratorium diagnostycznym potwierdza obecność mykoplazm urogenitalnych w próbkach klinicznych, ale wyniki te nie korespondują w wynikami analiz genetycznych. Zestaw IST2 identyfikuje jedynie rodzaj *Ureaplasma*, jak jednak wskazuje analiza molekularna, na podłożu wykorzystywanym do identyfikacji wzrasta zarówno uznawany za patogenny *U. urealyticum*, jak również *U. parvum*, który nie jest uznawany za gatunek chorobotwórczy. Jak pokazują nasze wyniki *U. parvum* jest zidentyfikowane metodami molekularnymi znacznie częściej albo jako jedyny izolat w próbce, albo też współwystępuje on z *U. urealyticum*. Wyjaśnienie tego jest proste. *U. urealyticum* po raz pierwszy wyizolowano w 1954 r., zaś rodzaj *Ureaplasma* ustanowiono w 1974 r. Do roku 2002 *U. urealyticum* uważano za jedyny gatunek tego rodzaju, o którym wiadomo było, że może zakażać ludzi. W obrębie gatunku wyróżniono 14 serowarów, jednak analiza genetyczna i klasyfikacja na podstawie sekwencji genów 16S rRNA potwierdziły odrębność części serowarów i tak serotypy 1, 3, 6 i 14 sklasyfikowano jako nowy gatunek *Ureaplasma parvum*, podczas gdy *U. urealyticum* obejmuje pozostałe 10 serotypów [46]. Gatunki te jednak pod względem morfologii i fizjologii są nieodróżnialne, zatem test biochemiczny nie pozwala na przypisanie izolatu do gatunku, a jedynie do rodzaju *Ureaplasma*, a jedyny sposób rozróżnienia gatunków to analiza genetyczna. Taki stan rzeczy wydaje się pro-

blematyczny z klinicznego punktu widzenia, ponieważ w przypadku dodatniego wyniku testu biochemicznego nie wiadomo czy do czynienia mamy z kolonizacją czy już z zakażeniem. Rodzi się zatem pytanie czy pacjentki z dodatnim testem *Ureaplasma* spp. należy leczyć czy też u każdej takiej pacjentki powinno się potwierdzać obecność *U. urealyticum* w dodatkowym teście molekularnym?

W przeprowadzonych analizach nie potwierdzono obecności *M. genitalium*, prawdopodobnie ze względu na dużą wrażliwość tego gatunku na warunki środowiskowe i jego zmniejszoną żywotność w hodowli. Zaskakujące są natomiast wyniki identyfikujące *M. hominis*. Zestaw *Mycoplasma* IST2 nie potwierdza obecności tego gatunku w analizowanych próbach, natomiast w 20 przypadkach wzrost *Mycoplasma* spp. zaobserwowano na podłożu stałym A7. Ich obecność potwierdziła także analiza genetyczna. Rodzaj *Mycoplasma* zidentyfikowano w 99/100 próbach, a gatunek *M. hominis* oznaczono w 49,5% tych prób. Rozbieżności wyników uzyskanych metodami hodowlanymi przypisać można, przynajmniej częściowo, ogólnie uznawanym trudnościom w hodowli i izolowaniu mykoplazm, ale być może także istotny jest czas inkubacji prób w przypadku zestawu *Mycoplasma* IST2 [47]. *M. hominis* jest gatunkiem, którego czas generacji wynosić może kilka godzin. Niewielka liczba komórek w materiale klinicznym może skutkować wydłużonym czasem potrzebnym do osiągnięcia gęstości hodowli wpływającej na zmianę pH pożywki i tym samym widoczną zmianę jej zabarwienia. Zatem krótki czas inkubacji zestawu IST2 może wpływać na uzyskanie wyniku fałszywie ujemnego. Małą liczbę prób dodatnich na podłożu stałym A7 tłumaczyć można natomiast tym, że próbki były na nie przesiewane dopiero z podłoża R1+R2 zestawu IST2, a nie bezpośrednio z materiału klinicznego, co mogło znacząco wpłynąć na żywotność mykoplazm. Rozważając przyczyny rozbieżności wyników hodowli i badań molekularnych należy też brać pod uwagę fakt, że PCR wykrywa obecność DNA w niewielkich ilościach, ale także DNA martwych organizmów oraz tylko jego fragmenty. W hodowli natomiast niezbędne są żywe komórki zdolne do podziałów, zatem zbyt mała ich liczba albo też brak ich zdolności do namnażania może dawać wynik ujemny w hodowli.

Pomimo potwierdzenia obecności *Mycoplasma* spp. w prawie wszystkich próbach (99/100), w 50 przypadkach nie udało się zidentyfikować gatunku. Świadczyć to może albo o zbyt małej specyficzności zastosowanych starterów PCR, albo obecności gatunku innego niż poszukiwane *M. hominis* i *M. genitalium*.

Zwiększona czułość w wykrywaniu mykoplazm za pomocą PCR jest zgodna z literaturą [48-49], co nie jest zaskakujące, biorąc pod uwagę fakt, że mykoplazmy są organizmami pozbawionymi ściany komórkowej i bardzo wrażliwymi na warunki środowiskowe. Jak dotąd nie wykazano jednak tak dużej rozbieżności w ocenie obecności *M. hominis* metodami hodowlanymi i molekularnymi.

Współwystępowanie kilku gatunków mykoplazm urogenitalnych w narządach moczowo-płciowych ludzi jest powszechne jak wskazują np. Taylor-Robinson i Jensen (2010). W analizowanych próbkach test IST2 nie wykazał jednak tego zjawiska. Potwierdziły to dopiero analizy molekularne. PCR pokazał obecność *Mycoplasma* spp. wraz z *U. parvum* i/lub *U. urealyticum* w prawie wszystkich próbkach (99/100). Wyniki te są zgodne z danymi literaturowymi, jednak do tej pory nikt nie zgłosił obecności dwóch/ trzech różnych gatunków mykoplazm urogenitalnych w tak dużej liczbie badanych prób.

Zdolność do różnicowania mykoplazm i ureaplazm w próbkach klinicznych nadal stanowi wyzwanie dla diagnostów i badaczy. Rozróżnianie *U. urealyticum* i *U. parvum* wydaje się szczególnie zasadne zakładając, że to ten pierwszy gatunek stanowi czynnik etiologiczny zakażeń układu moczowo-płciowego. W związku z zaobserwowanym stanem rzeczy właściwe wydaje się stosowanie testu diagnostycznego opartego na hodowli jedynie w celach przesiewowych albo też łączenie metod hodowlanych i molekularnych w identyfikacji mykoplazm urogenitalnych oraz sprawdzanie pod kątem ich obecności również prób ujemnych w hodowli, jeśli objawy kliniczne badanej pacjentki wskazują na możliwy udział drobnoustrojów atypowych w infekcji. Uzasadniona byłaby też próba podjęcia opracowania metody potwierdzającej obecność mykoplazm w sposób pewny i niezawodny. Najbardziej właściwym wydaje się w tej sytuacji zastosowanie nowocześniejszych i czulszych technik molekularnych, takich jak Real-Time PCR, który daje również możliwość jednoczesnego oceniania ilościowego materiału.

PIŚMIENNICTWO

1. Razin S, Yogev D, Naot Y (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microb Mol Biol Rev* 62: 1094-156
2. International Committee on Systematic Bacteriology-Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. Revised minimum standards for description of new species of the class Mollicutes (Division Tenericutes) (1995) *Int J Syst Bacteriol* 45: 605-612
3. Waites KB, Katz B, Schelonka RL (2005) Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev* 18: 757-789
4. Uuskula A, Kohl PK (2002) Genital mycoplasmas, including *Mycoplasma genitalium*, as sexually transmitted agents. *International Journal of STD & AIDS* 13: 79-85
5. Novy MJ, Duffy L, Axthelm MK (2009) *Ureaplasma parvum* or *Mycoplasma hominis* as sole pathogens cause chorioamnionitis, preterm delivery, and fetal pneumonia in rhesus macaques. *Reprod Sci*, 16 (1): 56-70
6. Sanchez PJ, Regan JA (1990) Vertical transmission of *Ureaplasma urealyticum* from mothers to preterm. *Pediatr Infect Dis J*, 9: 398-401
7. Kim Y, Kim J, Lee KA (2014) Prevalence of sexually transmitted infections among healthy Korean women: implications of multiplex PCR pathogen detection on antibiotic therapy. *J Infect Chemother* 20: 74-76
8. Leli C, Mencacci A, Latino MA (2017) Prevalence of cervical colonization by *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* in childbearing age women by a commercially available multiplex realtime PCR: An Italian observational multicentre study. *J Microbiol Immunol Infect* 17: 30091-30099
9. Esen B, Gozalan A, Sevindi DF (2017). *Ureaplasma urealyticum*: presence among sexually transmitted diseases. *Jpn J Infect Dis* 70: 75-79
10. Marovt M, Kese D, Kotar T (2015). *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* detected with the same frequency among women with and

- without symptoms of urogenital tract infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34: 1237-1245
11. Lobao TN, Campos GB, Selis NN (2017) *Ureaplasma urealyticum* and *U. parvum* in sexually active women attending public health clinics in Brazil. *Epidemiol Infect* 145: 2341-2351
 12. Kyndel A, Elmer C, Kallman O, Altman D (2016) *Mycoplasmataceae* colonizations in women with urethral pain syndrome: A case-control study. *J Low Genit Tract Dis* 20: 272-274
 13. Ouzounova-Raykova VV, Markovska R, Mizgova G, Mitov IG (2011) Detection of the sexually transmissible genital mycoplasmas by polymerase chain reaction in women. *Sex Health* 8: 445-446
 14. Waites KB, Bebear CM, Robertson JA, Talkington DF, Kenny GE (2001) Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections – Ed American Society for Microbiology, 1-30
 15. Luki, N, Lebel P, Boucher M, Doray B, Turgeon J, Brousseau R (1998) Comparison of polymerase chain reaction assay with culture for detection of genital mycoplasmas in perinatal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17: 255-263
 16. Knox CL, Timms P (1998) Comparison of PCR, nested PCR, and random amplified polymorphic DNA PCR for detection and typing of *Ureaplasma urealyticum* in specimens from pregnant women. *J Clin Microbiol* 36: 3032-3039
 17. Kong F, Ma Z, James G, Gordon S, Gilbert GL (2000) Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. *J Clin Microbiol* 38: 1175-1179
 18. Amirmozafari N, Mirnejad R, Kazemi B, Sariri E, Bojari MR, Darkahi FD (2009). Comparison of polymerase chain reaction and culture for detection of genital mycoplasmas in clinical samples from patients with genital infections. *Saudi Med J* 30: 1401-5
 19. Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik NG, Venezia RA (2004). Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas. *J Clin Microbiol* 42: 1528-1533.
 20. Frølund M, Bjørnelius E, Lidbrink P, Ahrens P, Jensen JS (2014). Comparison between culture and a multiplex quantitative real-time polymerase chain reaction assay detecting *Ureaplasma urealyticum* and *U. parvum*. *PLoS One* 21; 9 (7)
 21. Férandon C., Peuchant O., Janis C., Benard A., Renaudin H., Peyre S., Bébéar C (2011) Development of a real-time PCR targeting the *uidC* gene for the detection of *Mycoplasma hominis* and comparison with quantitative culture. *Clin Microbiol Infect* 17: 155-159
 22. Irajian G, Sharifi M, Mirkalantari S, Mirnejad R, Jalali Nadoushan MR, Ghorbanpour N (2016) Molecular detection of *Ureaplasma urealyticum* from prostate tissues using PCR-RFLP. *Iran J Pathol* 11: 138-143
 23. Jamalizadeh Bahaabadi S, Mohseni Moghadam N, Kheirkhah B, Farsinejad A, Habibzadeh V (2014) Isolation and molecular identification of *Mycoplasma hominis* in infertile female and male reproductive system. *Nephrourol Mon* 6: e22390
 24. Scov Jensen J, Uldum SA, Søndergård-Andersen J, Vuust J, Lind K (1991) Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 29: 46-50
 25. Xiao L, Glass JL, Paralanov V (2010) Detection and characterization of human *Ureaplasma* species and serovars by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 48: 2715-23
 26. Taylor-Robinson D, Jensen JS (2010) Genital mycoplasmas. In: Morse SA *et al.* (eds). *Atlas of sexually transmitted diseases and AIDS*. 4th edn. Elsevier, pp. 64-71.
 27. Remington J, Klein J, Wilson C, Nizet V, Maldonado Y (2010) Mycoplasmal infections. In: *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn*. Elsevier Saunders, Amsterdam
 28. Kafetzis DA, Skevaki CL, Skouteri V, Gavriili S, Peppas K, Kostalos C, Petrochilou V, Michalakis S (2004) Maternal genital colonization with *Ureaplasma urealyticum* promotes preterm delivery: association of the respiratory colonization of premature infants with chronic lung disease and increased mortality. *Clin Infect Dis* 39: 1113-1122
 29. González Bosquet E, Gené A, Ferrer I, Borrás M, Lailla JM (2006) Value of endocervical *Ureaplasma* species colonization as a marker of preterm delivery. *Gynecol Obstet Invest* 61: 119-123
 30. Lukic A, Canzio C, Patella A, Giovagnoli M, Cipriani P, Frega A, Moscarini M (2006) Determination of cervicovaginal microorganisms in women with abnormal cervical cytology: the role of *Ureaplasma urealyticum*. *Anticancer Res* 26: 4843-4849
 31. Zdrodowska-Stefanow B, Klosowska WM, Ostaszewska-Puchalska I, Bulhak-Kozioł V, Kotowicz B (2006) *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infection in women with urogenital diseases. *Adv Med Sci* 51: 250-253
 32. Kalinka J, Krajewski P, Sobala W, Wasiele M, Brzezińska-Błaszczyk E (2006) The association between maternal cervicovaginal proinflammatory cytokines concentrations during pregnancy and subsequent early-onset neonatal infection. *J Perinat Med* 34: 371-377
 33. Povlsen K, Jensen JS, Lind I (1998) Detection of *Ureaplasma urealyticum* by PCR and biovar determination by liquid hybridization. *J Clin Microbiol* 36: 3211-216
 34. Abele-Horn M, Wolff C, Dressel P, Pfaff F, Zimmermann A (1997) Association of *Ureaplasma urealyticum* biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients, and gynecological patients with pelvic inflammatory disease. *J Clin Microbiol* 35: 1199-1202
 35. Sleha R, Boštíková V, Hampl R (2016) Prevalence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in women undergoing an initial infertility evaluation. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 65: 232-237
 36. Grattard F, Soleihac B, De Barbeyrac B, Bebear C, Seffert P, Pozzetto B (1995) Epidemiologic and molecular investigations of genital mycoplasmas from women and neonates at delivery. *Pediatr Infect Dis J* 14: 853-858
 37. Friedek D, Ekiel A, Chelmicki Z, Romanik M (2004) HPV, *Chlamydia trachomatis* and genital mycoplasmas infections in women with low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL). *Ginekol Pol* 75: 457-463.
 38. Friedek D, Ekiel A, Romanik M, Chelmicki Z, Wiechula B, Wilk I, Józwiak J, Martirosian G (2005) Co-occurrence of urogenital mycoplasmas and group B streptococci with chlamydial cervicitis. *Pol J Microbiol* 54: 253-255
 39. Zdrodowska-Stefanow B, Klosowska WM, Ostaszewska-Puchalska I, Bulhak-Kozioł V, Kotowicz B (2006) *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infection in women with urogenital diseases. *Adv Med Sci* 51: 250-253
 40. Ekiel AM, Friedek DA, Romanik MK, Józwiak J, Martirosian G (2009) Occurrence of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* in women with cervical dysplasia in Katowice, Poland. *J Korean Med Sci* 24: 1177-1181
 41. Horváth B, Turay A, Lakatos F, Végh G, Illei G (1989) Incidence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* infection in pregnant women and gynaecological patients. The effectivity of Doxycyclin therapy. *Therapia Hung* 37: 23
 42. Katz B, Patel P, Duffy L, Schelonka RL, Dimmitt RA, Waites KB (2005) Characterization of ureaplasmas isolated from preterm infants with and without bronchopulmonary dysplasia. *J Clin Microbiol*. 43: 4852-4854
 43. Rastawicki W, Kalota H, Jagielski M, Gierczyński R (2004) Comparison of polymerase chain reaction assay and Mycoplasma IST 2 test with culture for detection of infections caused by *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis*. *Med Dosw Mikrobiol* 56: 99-108
 44. Yokoi S, Maeda S, Kubota Y, Tamaki M, Mizutani K, Yasuda M, Ito S, Nakano M, Ehara H, Deguchi T (2007) The role of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* biovar 2 in postgonococcal urethritis. *Clin Infect Dis* 45: 866-871
 45. Waites KB., Taylor-Robinson D (2011) *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. In: Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock DW, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 10 edn, pp 970-985. ASM Press; Washington, DC
 46. Robertson JA, Stemke GW, Davis Jr. JW (2002) Proposal of *Ureaplasma parvum* sp. nov. and emended description of *Ureaplasma urealyticum* (Shepard *et al.*, 1974) *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 587-597
 47. Robertson J, Gomersall M, Gill P (1975) *Mycoplasma hominis*: growth, reproduction, and isolation of small viable cells. *J Bacteriol* 124: 1007-1018

48. Jamalizadeh Bahaabadi S, Mohseni Moghadam N, Kheirkhah B, Farsinejad A, Habibzadeh V (2014) Isolation and molecular identification of *Mycoplasma hominis* in infertile female and male reproductive system. Nephrourol Mon 6: e22390

49. de Francesco MA, Negrini R, Pinsi G, Peroni L, Manca N (2009) Detection of *Ureaplasma* biovars and polymerase chain reaction-based subtyping of *Ureaplasma parvum* in women with or without symptoms of genital infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 6: 641-645

Detection of urogenital mycoplasmas in clinical samples

Sylwia Andrzejczak-Grządko¹✉, Izabela Dolińska²

¹Department of Microbiology and Genetics, Faculty of Biological Sciences, University of Zielona Góra

²Department of Laboratory Diagnostics, K. Marcinkowski University Hospital in Zielona Góra

✉corresponding author: s.andrzejczak-grzadko@wnb.uz.zgora.pl

Key words: *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. parvum*, *U. urealyticum*, PCR, Mycoplasma IST2

ABSTRACT

Urogenital mycoplasmas belonging to *Mycoplasma* and *Ureaplasma* genera, are both commensal and pathogenic microorganisms. The gold standard for their detection in clinical samples is culture and identification based on biochemical tests. However, this method is time-consuming and not very specific. Detection of mycoplasmas using PCR allows for assigning not only to the genus, but also to the species. In this study, 100 clinical samples were analyzed to identify *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. parvum* and *U. urealyticum*, using both biochemical and molecular methods. The presented results confirm the low specificity of biochemical tests and the higher detection efficiency of individual species using molecular methods.