

*Małgorzata Biernat-Sudolska<sup>1</sup>, Damuta Rojek-Zakrzewska<sup>1</sup>,  
Beata Rzepecka-Węglarz<sup>2</sup>, Joanna Woźniak<sup>2</sup>, Ryszard Lauterbach<sup>2</sup>*

## WPŁYW ZAKAŻENIA UREAPLAZMAMI NA STAN KLINICZNY NOWORODKÓW

<sup>1</sup>Zakład Wirusologii Katedra Mikrobiologii CM UJ

Kierownik Katedry Mikrobiologii: Piotr Heczko

<sup>2</sup>Klinika Neonatologii CM UJ

Kierownik Kliniki Neonatologii: Ryszard Lauterbach

*Praca jest próbą odpowiedzi na pytanie, czy zakażenie dróg oddechowych noworodków ureaplazmami ma różny przebieg kliniczny w zależności od izolowanego gatunku.*

*Słowa kluczowe: ureaplazma, noworodek, dysplazja oskrzelowo-płucna, chroniczne choroby płuc*

*Key words: ureaplasma, newborn, broncho-pulmonary dysplasia, chronic lung diseases*

### WSTĘP

Ureaplazmy często kolonizują dolne drogi płciowe kobiet ciężarnych i są wertykalnie przenoszone na dzieci. Wśród dzieci przedwcześnie urodzonych ryzyko takiej transmisji jest odwrotnie proporcjonalne do ich wagi urodzeniowej (1). Nadmierna kolonizacja dróg rodnych ureaplazmami ( $>10^4$ ) może być przyczyną komplikacji w przebiegu ciąży takich jak: przedwczesne pęknięcie błon płodowych (PROM), przedwczesny poród, zakażenie noworodka z objawami ze strony układu oddechowego: zapalenie płuc, dysplazja oskrzelowo-płucna (BPD – *bronchopulmonary dysplasia*), późniejszy rozwój przewlekłych chorób płuc (CLD – *chronic lung diseases*), a także stosunkowo rzadkie w populacji noworodków sepsa i zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (2,3). Nie jest jasna rola ureaplazm w rozwoju chorób układu oddechowego noworodków. Nie wiadomo, czy zakażenie tymi bakteriami jest pierwotną przyczyną BPD oraz chorób o charakterze przewlekłym, czy też obecność ureaplazm należałoby traktować wyłącznie jako marker rozwijającej się z innych przyczyn choroby płuc. Niektórzy badacze popierający tę tezę uważają bowiem, iż chore dzieci z niską wagą urodzeniową (VLBW – *very low birth weight*), są prawdopodobnie łatwiej kolonizowane ureaplazmami w przebiegu zakażenia wewnątrzrodniowego u matki. Poza tym po urodzeniu wymagają często intensywniejszych zabiegów terapeutycznych (np. tlenoterapii) sprzyjających rozwojowi BPD/CLD (4,5).

Szczególnie często obserwuje się kolonizację w grupie dzieci z VLBW. U noworod-

ków poniżej 1000 g ocenia się ją na 85-90% (6). Nie jest jasne, dlaczego u dzieci z VLBW transmisja ta jest tak częsta. Być może odgrywają w tych procesach czynniki związane z samym gospodarzem, np. dotyczące miejsc receptorowych na błonie śluzowej lub też różnice w wirulencji poszczególnych serotypów ureaplazm.

Profilaktyka antybiotykowa BPD i CLD u dzieci z VLBW, u których stwierdza się kolonizację ureaplazmami jest kontrowersyjna, gdyż nie zawsze przynosi oczekiwaną poprawę stanu klinicznego, a ze względu na wysoką toksyczność leków może przyczyniać się do wzrostu śmiertelności w tej grupie noworodków (7,8).

Obecnie 14 serotypów ureaplazm grupuje się w jednostki zwane biotypami, którym proponuje się przyznać status gatunków. Serotypy 1,3,6,14 zalicza się do biotypu 1 (gatunek *Ureaplasma parvum*; U.p.); serotypy 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 do biowaru 2 (*Ureaplasma urealyticum*; U.u.). Większość izolowanych od ludzi szczepów należy do bioty-pu 1. Prawdopodobnie niektóre serotypy są związane częściej z objawami chorobowymi niż inne, uznawane za składnik flory fizjologicznej dróg płciowych aktywnych seksualnie kobiet.

Wykrywanie zakażeń ureaplazmami jest trudne ze względu na specyficzne cechy tych drobnoustrojów. Bardzo duże wymagania odżywcze, powolny wzrost oraz małe rozmiary powodują, że ich diagnostyka wykonywana jest w niewielu ośrodkach na terenie naszego kraju. Powszechnie stosowane dziś przez położników antybiotyki, hamując wzrost szczepów ureaplazm, ograniczają niezawodność metody hodowlanej do ich identyfikacji. Nowoczesne metody biologii molekularnej pozwalają na znaczne skrócenie czasu oczekiwania na wynik badania. Umożliwiają również identyfikację dwóch gatunków ureaplazm występujących u ludzi, dzięki czemu możliwa będzie ocena różnic w ich patogenności. Ponadto wprowadzenie metod PCR do wykrywania ureaplazm i identyfikacji gatunkowej może przyczynić się do wyjaśnienia związków między kolonizacją przez te drobnoustroje dróg rodnych matki a późniejszym rozwojem chorób noworodków.

Celem badań była ocena stanu klinicznego noworodków, u których wykazano obecność U.p. i U.u. w wydzielinie dróg oddechowych.

## MATERIAŁ I METODY

Badaną grupę stanowiło 50 wcześniaków z zaburzeniami oddechowymi, u których potwierdzono metodą hodowlaną obecność ureaplazm w drogach oddechowych. W większości przypadków (80%) ciążę rozwiązano drogą cesarskiego cięcia. Średnia masa urodzeniowa dzieci wynosiła 1126 g, a punktacja w skali Abgar po 1 minucie 5 punktów.

U noworodków z zespołem zaburzeń oddychania stosowano wentylację mechaniczną. Gdy dziecko oddychało samodzielnie, ale ze względu na niedojrzałość płuc lub zakażenie wentylacja ta nie była w pełni wydolna, poprawiano jej efektywność stosując mniej inwazyjne wsparcie oddechu w systemie nCPAP (wspomaganie oddechu na zasadzie utrzymywania stałego dodatniego ciśnienia w górnych drogach oddechowych).

Dodatkowo, u niedojrzałych, przedwcześnie urodzonych noworodków, stosowano dotchawczo surfaktant (Survanta lub Curosurf w dawkach 100-200 mg /kg m.c.). Zależnie od stanu klinicznego pacjenta dawki powtarzano, a u niemowląt z zapaleniem płuc przepłukiwano także drzewo oskrzelowe.

Od każdego dziecka pobierano aspirat tchawiczy na podłoże transportowe firmy Bio-

Merieux, z którego następnie dokonywano przesiewu na podłoża hodowlane BioMerieux oraz płynne i stałe PPLO wg Hayflicka (9). Na podłożach PPLO obecność ureaplazm wykazywano po stwierdzeniu alkalizacji podłoża płynnego i charakterystycznych kolonii ureaplazm na agarze PPLO. Dodatni wynik testu BioMerieux odczytywano po 48 h od wysiania materiału, po zaobserwowaniu alkalizacji podłoża.

Identyfikację gatunkową przeprowadzano za pomocą metody PCR stosując 2 pary primerów swoistych dla *U.u.* i *U.p.*, których sekwencje opisali Kong i wsp. (10). Izolacji DNA dokonywano z podłoża transportowo-hodowlanego firmy Bio-Merieux w 18-24 godz. inkubacji. Po uprzednim odwirowaniu materiału przy 14 tys. g/min. stosowano denaturację w temperaturze 95°C przez 5 min. Prowadzono 30 cykli w następujących warunkach: 95°C/5 min., 92°C/1,5 min., 72°C/1,5 min., 72°C/8 min.. Mieszanina reakcyjna (25 µl) zawierała: bufor (1x), MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTP 0,2 mM, primery 10 pM, Taq polimeraza (0.5U TIB MOLBIOL), badana próbka – 5µl. Kontrolę dodatnią stanowiło DNA wyizolowane ze szczepów wzorcowych *U.u.* i *U.p.*, pozyskanych z amerykańskiej kolekcji szczepów i linii komórkowych (ATCC 27816 i 27815). W każdym ujemnym przypadku reakcji PCR wyeliminowano możliwość wystąpienia fałszywie ujemnego wyniku na skutek hamowania reakcji PCR przez nieswoiste inhibitory, powtarzając reakcję PCR w obecności DNA izolowanego z wzorcowego szczepu ureaplazm jako kontroli zewnętrznej. Detekcji produktu PCR dokonywano przeprowadzając elektroforezę w 2% żelu agarozowym z dodatkiem 3µl bromku etydyny. Prażki uwidaczniawo w świetle UV.

Dodatkowo przeprowadzono badania w kierunku: *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* (Mh) i innych bakterii Gram (+) i Gram (-) oraz *Pneumocystis carinii* i *Candida albicans*.

Dzieci, których stan kliniczny wymagał antybiotykoterapii, zakażenie ureaplazmowe leczono podając dożylnie klarytromycynę (Klacid) w 2 dawkach (15 mg/kg m.c.) przez 5 dni lub ciprofloxacynę średnio przez 8 dni w dawce 10 mg/kg m.c./dobę u dzieci z masą ciała < 1250 g oraz 30 mg/kg m.c./dobę u noworodków z masą ciała >1250g. Inne współistniejące zakażenia leczono antybiotykami kierując się stanem klinicznym noworodka, danymi epidemiologicznymi i wynikami badania lekowrażliwości.

W analizie stanu klinicznego dzieci uwzględniono stan kliniczny dziecka w chwili urodzenia oraz konieczne leczenie wspomagające na oddziale intensywnej terapii.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W analizowanej grupie noworodków przeważał gatunek *U.p.* (80%). U 19 noworodków zakażenie ureaplazmowe współistniało z zakażeniem innymi drobnoustrojami. U 10 dzieci potwierdzono zakażenie *P.carinii*, u 13 zakażenie bakteriami Gram (-), u 9 Gram (+), w 1 przypadku wyizolowano *C.albicans*. Tylko u jednego noworodka wykazano obecność *Mycoplasma hominis*; dziecko zmarło w 11 dobie życia na skutek wylewu śródczaszkowego IV stopnia. Obserwowano 18% śmiertelność noworodków zakażonych ureaplazmami; 3 zgony zakwalifikowano jako wczesne (1 tydzień życia), a 6 jako późne. U zmarłych dzieci w 3 przypadkach wykryto *U.u.*, a u 6 *U.p.* Wszystkie zgony dotyczyły dzieci z wagą urodzeniową < 1 kg, urodzone przed 30 tygodniem życia płodowego.

Wyniki dotyczące wywiadu klinicznego i wydolności układu oddechowego zebrano w tabelach I i II.

Tabela I. Stan kliniczny noworodków zakażonych U.u. (n=10) i U.p. (n=40)

Table I. Clinical condition of newborns infected with U.u. (n=10) i U.p. (n=40)

| Analizowany parametr   | U.u.           | U.p.         |
|--|----------------|--------------|
| Liczba dzieci u których zastosowano wspomaganie respiratorem     | 8 (80%)        | 25 (63%)     |
| Średni czas wspomagania oddechu respiratorem                     | 19,5 ±31,9 dni | 6,5 ±9,5 dni |
| Liczba dzieci u których zastosowano wspomaganie w systemie nCPAP | 8 (80%)        | 24 (60%)     |
| Średni czas wspomagania w systemie nCPAP                         | 18,5 ±38,8 dni | 6,75         |
| Liczba dzieci u których zastosowano surfaktant                   | 8 (80%)        | 20 (50%)     |
| Średnia liczba podaży surfaktantu                                | 0,8 ±0,57      | 0,77 ±1,07   |
| Liczba dzieci wspomaganych respiratorem i w systemie nCPAP       | 6 (60%)        | 13 (32,5%)   |
| Liczba leczonych klarytromycyną                                  | 7 (70%)        | 21 (52,5%)   |
| Liczba noworodków z zakażeniami towarzyszącymi                   | 5 (50%)        | 13 (32,5%)   |
| Liczba zgonów  | 3 (33%)        | 6 (15%)      |

Tabela II. Wybrane dane dotyczące porodu i oceny poporodowej noworodków zakażonych ureaplazmami

Table II. Selected data relating to labour and postnatal evaluation of newborns infected with ureaplasmas

| Analizowany parametr                   | U.u. (n=10)      | U.p. (n=40)     |
|--|------------------|-----------------|
| Średnia waga urodzeniowa               | 915,5 ±145,35 kg | 1139 ±400,49 kg |
| Średnia w skali Apgar                  | 5 ±1,27          | 5,55 ±1,90      |
| Śr. tydzień życia płodowego            | 27,36 ±2,06      | 28,3 ±3,16      |
| Liczba dzieci urodzonych siłami natury | 2 (20%)          | 9 (22,5%)       |
| PROM*                                  | 2 (20%)          | 5 (12,5%)       |

\*przedwczesne pęknięcie błon płodowych

Rola ureaplazm w zaburzeniach oddechowych noworodków i ich związek z późniejszym rozwojem chorób płuc jest podejmowany w literaturze od dawna. Związek taki wydają się potwierdzać zarówno badania kliniczne jak i eksperymentalne, prowadzone na modelach mysich (11, 12). Wiadomo również, że niektóre z serotypów uznawane są za bardziej patogenne (13). Do tej pory jednak nie ma jednoznacznych informacji wskazujących na gorsze rokowanie w przypadku zakażenia jednym z dwóch gatunków ureaplazm.

Według danych literaturowych, częstość rozpowszechnienia obu gatunków ureaplazm w drogach moczowo-płciowych kobiet jest różna. Zdecydowanie częściej (nawet do 80%) izolowany jest gatunek *U.parvum* (14,15). Jednakże zakażenie *U.u.* jest częstsze u kobiet ze stanami zapalnymi dróg moczowo-płciowych, błon płodowych, jak i u ciężarnych kobiet z niepowodzeniami ciążowymi (13). W naszych badaniach u większości wcześniaków z zaburzeniami oddechowymi, u których potwierdzono obecność ureaplazm w drogach

oddechowych, został zidentyfikowany gatunek *U.p.* Biorąc pod uwagę, iż zakażenie noworodka jest zwykle konsekwencją wertykalnej transmisji, jest to zgodne z danymi literaturowymi.

Analizując stan kliniczny noworodków zakażonych różnymi gatunkami oceniono, iż dzieci zakażone gatunkiem *U.u.* charakteryzowały się niższą wagą urodzeniową, częściej wymagały wspomagania oddechu za pomocą respiratora lub w systemie nCPAP, częściej również wymagały podawania surfaktantu. Okres czasu, w którym konieczne było zastosowanie terapii wspomagającej oddech, był także dłuższy w tej grupie noworodków.

Ze względu na zły stan kliniczny noworodki zakażone *U.u.* częściej poddawano leczeniu z użyciem antybiotyków (klacid), a śmiertelność w tej grupie była wyższa niż w grupie noworodków zakażonych gatunkiem *U.p.*

## WNIOSKI

Wstępne wyniki naszych badań wskazują na gorszy stan kliniczny i gorsze rokowanie u wcześniaków z zaburzeniami oddechowymi, u których w drogach oddechowych wykazano obecność gatunku *U.u.*

*M Biernat-Sudolska, D Rojek-Zakrzewska, B Rzepecka-Węglarz, J Woźniak, R Lauterbach*

## INFLUENCE OF UREAPLASMA INFECTION ON THE CLINICAL STATE OF NEWBORNS

### SUMMARY

The aim of this study was the analysis of the clinical state of newborns infected with various species of ureaplasma. Methods: 50 prematurely born patients with respiratory disturbances and confirmed presence of ureaplasma in the respiratory tract were analyzed. Endotracheal aspirates were collected for examination. Presence of ureaplasma was confirmed by culture and a commercial test (Biomerieux), the ureaplasma species were identified using PCR. Results: in 40 examined newborns *Ureaplasma parvum* (*U.p.*) was found, in 10 *Ureaplasma urealyticum* (*U.u.*). Newborns infected with *U.u.* were subject to more frequent and longer therapeutic procedures supporting respiration (respirator, nCPAP), needed more frequent surfactant and antibiotic administration. In the mentioned group the mortality rate was 33%, while in newborns infected with *U.p.* it was 15%. Conclusions: initial results suggest worse clinical status and higher mortality of prematurely born infected with *Ureaplasma urealyticum*.

### PIŚMIENNICTWO

1. Regan JA, Greenberg EM. Perinatal *Ureaplasma urealyticum* infection and colonization: the association with preterm delivery and the spectrum of disease in neonates. *Rev Med Microbiol* 2001;12:97-107.
2. Waites K B, Crouse DT, Philips JB, i in. *Ureaplasma pneumonia* and sepsis associated with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics* 1989; 83:79-85.
3. Waites KB, Rudd PT, Crouse DT, i in. Chronic *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infection of central nervous system in preterm infants. *Lancet* 1988, I:17-21.

4. Groneck P, Schmale J, Soditt V, i in. Bronchoalveolar inflammation following airway infection in preterm infants with chronic lung disease. *Pediatr Pulmonol* 2001;31:331-338.
5. Hegee A., Bar-Shain D, Boxerbaum B, i in. Identification and quantification of ureaplasmas colonizing the respiratory tract and assessment of their role in the development of chronic lung disease in preterm infants. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:854-859.
6. Heggie A, Jacobs M, Butler V, i in. Frequency and significance of isolation of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* from cerebrospinal fluid and tracheal aspirate specimens from low birth weight infants. *J Pediatr* 1994;124:956-961.
7. Mhanna MJ, Delong LJ, Aziz HF. The Value of *Ureaplasma urealyticum* Tracheal Culture and Treatment in Premature Infants Following an Acute Respiratory Deterioration. *J Perinatol* 2003; 23:541-544.
8. Mabanta CG, Pryhuber GS, Weinberg GA, i in. Erythromycin for the prevention of chronic lung disease in intubated preterm infants at risk for colonized or infected with *Ureaplasma urealyticum*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2003;4 :CD003744 Review
9. Hayflick L. The Mycoplasmatales and the L-phase of bacteria. New York: Meredith Corporation, 1965.
10. Kong F, Ma Z, James G, i in. Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. *J Clin Microb* 2000; 1175-1179.
11. Viscardi RM, Kaplan J, Lovchik JC, i in. Characterization of Murine Model of *Ureaplasma urealyticum* Pneumonia. *Infect Immun* 2002; 70: 5721-5729.
12. Kotecha S Hodge R, Schaber R, i in. Pulmonary *Ureaplasma urealyticum* Is Associated with the Development of Acute Lung Inflammation and Chronic Lung Disease in Preterm Infants. *Pediatric Res* 2003;55:61-68.
13. Abele-Horn MC, Wolff P, Dressel F, i in. Association of *Ureaplasma urealyticum* biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients, and gynecological patients with pelvic inflammatory disease. *J Clin Microbiol* 1997;35:1199-1202
14. Kim M, Kim G, Romero R, i in. Biovar diversity of *Ureaplasma urealyticum* in amniotic fluid: distribution, intrauterine inflammatory response and pregnancy outcomes. *J Perinat Med* 2003; 31: 146-52.
15. Luki N, Lebel P, Boucher M, i in. Comparison of Polymerase Chain Reaction Assay with culture for Detection of Genital Mycoplasmas in Perinatal Infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:255-263.

Otrzymano: 14.11.2005 r.

**Adres autora:**

Małgorzata Biernat-Sudolska  
Zakład Wirusologii Katedra Mikrobiologii Collegium Medicum UJ  
ul. Czysła 18, 31-121 Kraków  
tel. 634 54 00  
e-mail: msudolsk@cm-uj.krakow.pl