

Małgorzata Biernat-Sudolska<sup>1</sup>, Danuta Rojek-Zakrzewska<sup>1</sup>, Artur Drzewiecki<sup>2</sup>,  
Ryszard Lauterbach<sup>3</sup>

WRAŻLIWOŚĆ NA ANTYBIOTYKI I CHEMIOTERAPEUTYKI  
*UREAPLASMA UREALYTICUM* I *UREAPLASMA PARVUM* IZOLOWANYCH  
OD NOWORODKÓW Z ZABURZENIAMI ODDECHOWYMI

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

<sup>2</sup>Zakład Bakteriologii Katedry Mikrobiologii CM UJ,

Kierownik Katedry Mikrobiologii: Piotr B. Heczko

<sup>3</sup>Klinika Neonatologii CM UJ

Kierownik Kliniki Neonatologii: Ryszard Lauterbach

*Praca omawia wyniki kontynuowanych badań nad dwoma gatunkami ureaplazm izolowanymi od ludzi. Sygnalizuje różnice dotyczące wrażliwości obu gatunków na antybiotyki.*

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

*Key words: ureaplasma, newborn, bronchopulmonary dysplasia, chronic lung diseases*

WSTĘP

Drobnoustroje z rodzaju *Ureaplasma* są przenoszone głównie drogą kontaktów seksualnych i często występują u młodych, aktywnych seksualnie kobiet. Obecnie od człowieka izoluje się dwa gatunki ureaplazm: *Ureaplasma parvum* (U.p.) tzw. biowar 1, do którego zalicza się serotypy 1,3,6,14 oraz gatunek *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) tzw. biowar 2, który grupuje serotypy 2, 4, 5, 7-13. Gatunek *U.p.* występuje u ludzi w drogach moczowo-płciowych czterokrotnie częściej niż *U.u.* Homologia kwasów nukleinowych między biowarami oceniana jest na 60% (1, 2, 3).

Uważa się, że ureaplazmy jako składnik fizjologicznej flory żeńskich dróg moczowo-płciowych mają niską wirulencję. Jednak wzrost liczebności populacji tych drobnoustrojów w drogach rodnych ( $>10^4$ ) może być przyczyną komplikacji w przebiegu ciąży, takich jak przedwczesne pęknięcie błon płodowych (PROM) i przedwczesny poród (4).

Kolonizacja dróg rodnych ureaplazmami nasila się zwłaszcza w trzecim trymestrze ciąży. Stwarza to możliwość wertykalnego przeniesienia zakażenia na noworodki. Do zakażenia ureaplazmami może dojść jeszcze w życiu płodowym *in utero* (drogą hematogenną lub

jako wynik wstępującej infekcji) albo w czasie porodu na skutek kontaktu dziecka z florą kanału rodnej matki (5).

Wynikiem wewnątrzmacicznego zakażenia płodu może być również jego niska waga urodzeniowa. Wśród dzieci przedwcześnie urodzonych ryzyko wertykalnej transmisji jest odwrotnie proporcjonalne do wagi urodzeniowej. Ureaplazmy izolowano z krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego, aspiratów tchawiczych i tkanki płucnej noworodków. Z mykoplazmowym zakażeniem w okresie okołoporodowym wiąże się wiele jednostek klinicznych, dotyczących układu oddechowego: zapalenie płuc, dysplazja oskrzelowo-płucna (BPD *brochopulmonary dysplasia*), późniejszy rozwój chronicznych chorób płuc (CLD *chronic lung diseases*), zapalenie węzłów chłonnych, osierdzia, opon mózgowo-rdzeniowych, ropnie tkanek miękkich i mózgu (5). Rola ureaplazm jako patogenów dróg oddechowych nie jest do końca wyjaśniona.

Prawdopodobnie niektóre serotypy ureaplazm są związane częściej z objawami chorobowymi niż inne. Wstępne wyniki wcześniejszych naszych badań sugerowały cięższy przebieg kliniczny u noworodków zakażonych gatunkiem *U.u.* (6). Dzieci te częściej wymagały wspomagania oddechu (respirator, nCPAP), częściej również wymagały podania antybiotyku. Celem niniejszej pracy była analiza lekowrażliwości *U. urealyticum* i *U. parvum* izolowanych od wcześniaków z zaburzeniami oddechowymi.

## MATERIAŁ I METODY.

Oceniano wrażliwość 73 szczepów ureaplazm na 9 leków przeciwbakteryjnych należących do 4 grup: tetracyklin (DOX — doksycyklina, TET — tetracyklina), makrolidów (JOS — josamycyna, AZY — azytromycyna, ERY — erytromycyna, CLA — klarytromycyna), fluorochinolonów (OFL — ofloksacyna, CIP — ciprofloksacyna) oraz streptogramin (PRI — pristinamycyna). Badanie przeprowadzono przy użyciu testu Mycoplasma IST 2 firmy BioMerieux. Wszystkie szczepy ureaplazm pochodziły od wcześniaków z zaburzeniami oddechowymi. Od każdego dziecka pobierano aspirat tchawiczy na podłoże transportowe firmy BioMerieux, z którego następnie dokonywano przesiewu na podłoże hodowlane BioMerieux oraz płynne i stałe PPLO wg Hayflicka (7). 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 wg zaleceń producenta.

Identyfikację gatunkową przeprowadzano metodą PCR stosując 2 pary starterów swoistych dla *U.u.* i *U.p.*, opisane przez Konga i wsp. [8]. Izolację DNA ureaplazm z podłoża transportowo-hodowlanego firmy Bio-Merieux w 18-24 godz. inkubacji przeprowadzano metodą denaturacji w temperaturze 95°C przez 5 min. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki amplifikacji opisano uprzednio [16]. Kontrolę dodatnią stanowiło DNA wyizolowane ze szczepów wzorcowych *U.u.* i *U.p.*, pochodzących z amerykańskiej kolekcji szczepów i linii komórkowych (ATCC 27816 i 27815). Produkt reakcji PCR uwiadczniano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny.

Wyniki poddano analizie statystycznej testem  $\chi^2$ .

## WYNIKI

Wyniki badania wrażliwości ureaplazm na antybiotyki i chemioterapeutyki przedstawia tabela I.

Tabela I. Odsetek wrażliwych szczepów ureaplazm

Table I. Percentage of susceptible ureaplasmas

	Tetracykliny			Makrolidy			Fluorochinolony		Streptograminy
	DOX	TET	JOS	AZY	CLA	ERY	OFL	CIP	PRI
<i>U. parvum</i> <i>n</i> =47	66	81	79	83	100	79	36	10	87
<i>U. urealyticum</i> <i>n</i> =26	69	69	54	67	92	46	27	17	65

DOX — doksycyklina, JOS — josamycyna, OFL — ofloksacyna, ERY — erytromycyna, TET — tetracyklina, CIP — cyprofloksacyna, AZY — azytromycyna, CLA — klarytromycyna, PRI — pristinamycyna

Wśród badanych szczepów było 47 należących do biowaru 1 (*U.p.*) oraz 26 należących do biowaru 2 (*U.u.*).

Na 7 z 9 badanych leków antibakteryjnych szczepy *U.u.* okazały się być bardziej odporne niż szczepy zidentyfikowane jako należące do biowaru *U.p.* Największe różnice, istotne statystycznie, dotyczyły antybiotyków z grupy makrolidów: josamycyny ( $p=0,05$ ) i erytromycyny ( $p=0,005$ ) oraz pristinamycyny ( $p=0,05$ ). Wrażliwość na doksycyklinę i ciprofloksacynę szczepów *U.u.* i *U.p.* była porównywalna.

## DYSKUSJA

Do badań został użyty powszechnie stosowany test Mycoplasma IST 2. Zaletą jego jest łatwość wykonania oraz możliwość szybkiej izolacji ureaplazm i szybkiego określenia wrażliwości wyizolowanego szczepu na 9 leków przeciwbakteryjnych. Jednakże wybrany przez producenta testu zestaw leków, na które oznacza się wrażliwość, nie w pełni jest reprezentatywny i adekwatny do współczesnych możliwości chemioterapii zakażeń mykoplazmowych i ureaplazmowych. Zestaw ten zawiera antybiotyki, które obecnie już prawie nie są stosowane w leczeniu (tetracyklina). Dla 2 z nich (para — josamycyna i erytromycyna) występuje dość rozbudowana oporność krzyżowa. W przypadku cyprofloksacyny i erytromycyny skuteczność kliniczna jest ograniczona. Zastosowanie pristinamycyny z powodu jej nienajlepszych właściwości farmakologicznych w leczeniu zakażeń mykoplazmowych i ureaplazmowych jest ograniczone. Ponadto nie zostały uwzględnione nowe antybiotyki dające obiecujące wyniki badań *in vitro* i pewnych doświadczeń klinicznych — telitromycyna

(ketolid — podgrupa makrolidów), tygecyklina (glicylocyklina — pochodna tetracyklin), lewofloksacyna i moksyfloksacyna (fluorochinolonolony „gram-dodatnie”) (9-11).

Planujemy wykonanie oznaczenia lekowrażliwości na te leki metodą rozcieńczeń w podłożu, w celu określenia ich potencjalnej przydatności. Należy jednak pamiętać, że metoda rozcieńczeń, jeśli laboratorium musi samo sporządzać podłoża z określonym stężeniem antybiotyków, nie najlepiej nadaje się do rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej. Alternatywna metoda E-test nie jest jeszcze wystarczająco wystandaryzowana w tym przypadku (12). Być może wskazane jest zrewidowanie zestawu antybiotyków, aby poprawić jego przydatność — np. mógłby on zawierać: doksycyklinę, tygecyklinę, klarytromycynę, azytromycynę, telitromycynę, lewofloksacynę, moksyfloksacynę.

Wysokie odsetki szczepów ureaplazm opornych na antybiotyki często stosowane w leczeniu zakażeń *Chlamydia trachomatis* (doksycyklina, azytromycyna, cyprofloksacyna) mogą sugerować, że jest to skutek presji selekcyjnej wynikającej z nieprawidłowego leczenia chlamydioz. W polskich warunkach nagminnie stosuje się cyprofloksacynę — lek o dość niskiej aktywności wobec *C. trachomatis* i tym samym ograniczonej skuteczności w zakażeniach układu moczowo-płciowego drobnoustrojami atypowymi (13).

Wyniki powyższych badań potwierdzają słuszość postępowania klinicznego polegającego na włączaniu klarytromycyny (Klacid) dożylnie w dawce 15 mg/kg masy ciała w 2 dawkach przez 5 dni, jeszcze przed uzyskaniem wyniku oznaczania lekowrażliwości, jeśli u noworodka badania potwierdziły obecność ureaplazm. Przyjęta przez nas ta zasada jest słuszna, ponieważ odsetek wrażliwych szczepów ureaplazm jest najwyższy dla tego antybiotyku.

Z uwagi na coraz większy odsetek szczepów opornych na tradycyjnie stosowane antybiotyki, konieczne jest szersze stosowanie nowych leków. Ponadto potrzebne są badania dotyczące bezpieczeństwa stosowania nowych antybiotyków u noworodków szczególnie z niską wagą urodzeniową.

## WNIOSKI

1. Wyższe odsetki opornych szczepów *U. urealyticum* mogą być przyczyną trudności terapeutycznych zakażeń przezeń spowodowanych.
2. Konieczne jest oznaczanie wrażliwości ureaplazm na antybiotyki, ponieważ narastający odsetek szczepów opornych może być przyczyną coraz częstszych niepowodzeń w terapii empirycznej.

*M Biernat-Sudolska, D Rojek-Zakrzewska, A Drzewiecki, R Lauterbach*

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *UREAPLASMA UREALYTICUM* AND *UREAPLASMA PARVUM* ISOLATED FROM PREMATURE INFANTS WITH RESPIRATORY DISORDERS

## SUMMARY

The aim of the study was to analyse antimicrobial susceptibility of ureaplasmas isolated from the tracheal aspirates from premature infants with respiratory disorders. The study encompassed 73 ureaplasma strains, 47 belonging to *U. parvum* (*U.p.*) species and 26 to *U. urealyticum* (*U.u.*).

The strains were isolated paralelly on BioMerieux as well as liquid and solid PPLO media. Identification of studied strains was performed using PCR with primers specific to both ureaplasma species. Susceptibility to doxycycline (DOX), tetracyclin (TET), josamycin (JOS), azithromycin (AZY), erythromycin (ERY), clarytromycin (CLA), ofloxacin (OFL), ciprofloxacin (CIP), pristinamycin (PRI) was tested using a BioMerieux Mycoplasma IST 2 kit. Results: in 7 of 9 examined antimicrobials the percentage of susceptible U.u. was lower than the percentage of U.p. susceptible strains. Conclusions: The biggest differences related to susceptibility referred to macrolides. Higher resistance of U.u. species to antimicrobials may suggest its higher pathogenicity.

## PIŚMIENNICTWO

1. 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.
2. 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.
3. Kong F, James G, Ma Z i in. Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum*-support for the establishment of a new species *Ureaplasma parvum*. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49: 1879-1889.
4. Kundsın RB, Leviton A, Alred EN i in. *Ureaplasma urealyticum* infection of the placenta in pregnancies that ended prematurely. *Obstet Gynecol* 1996; 87: 122-125.
5. Weites K B, Katz B, Schelonka R L. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 757-789.
6. Biernat-Sudolska M, Rojek-Zakrzewska D, Rzepecka-Węglorz B i in. Wpływ zakażenia ureaplazmami na stan kliniczny noworodków. *Przegl Epidemiol* 2006; 60: 53-58.
7. Hayflick L. The Mycoplasmatales and the L-phase of bacteria. New York: Meredith Corporation, 1965.
8. Kong F, Ma Z, James G, Gordon S, Gilbert G. Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. *J Clin Microb* 2000; 38: 1175-1179
9. Kenny GE, Cartwright FD. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *M. pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to GAR-936, dalfofristin, dirithromycin, evernimicin, gatifloxacin, linezolid, moxifloxacin, quinupristin-dalfopristin, and telithromycin compared to their susceptibilities to reference macrolides, tetracyclines, and quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2604-2608.
10. Aydin D, Kucukbasmaci O, Gonullu N, i in. Susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* and *Ureaplasma urealyticum* isolates from male patients with urethritis to several antibiotics including telithromycin. *Chemotherapy* 2005; 51: 89-92.
11. Waites KB, Crabb DM, Bing X, i in. *In vitro* susceptibilities to and bactericidal activities of garenoxacin (BMS-284756) and other antimicrobial agents against human mycoplasmas and ureaplasmas. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 161-165.
12. Cakan H, Polat E, Kocazeybek B, i in. Assessment of antibiotic susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* from prostitutes and outpatient clinic patients using the E-test and agar dilution method. *Chemotherapy* 2003; 49: 39-43.
13. Drury NE, Dyer JP, Breitenfeldt N, i in. Management of acute epididymitis: are European guidelines being followed? *Eur Urol* 2004; 46: 522-525.

Otrzymano: 5.12.2006 r.

**Adres autora:**

Małgorzata Biernat-Sudolska

Zakład Wirusologii Katedra Mikrobiologii Collegium Medicum UJ

ul. Czysła 18, 31-121 Kraków,

tel.012/634-54-00; e-mail: msudolsk@cm-uj.krakow.pl