

Małgorzata Biernat-Sudolska*, Danuta Rojek-Zakrzewska*, Artur Drzewiecki**

GŁOS W SPRAWIE LECZENIA ZAKAŻEŃ UREAPLAZMOWYCH

VOICE ON THE TREATMENT OF UREAPLASMAS INFECTIONS

* Zakład Wirusologii, Katedra Mikrobiologii CM UJ

** Zakład Epidemiologii Zakażeń, Katedra Mikrobiologii CM UJ

Kierownik Katedry Mikrobiologii: Piotr Heczko

STRESZCZENIE

Ureaplazmy (*Ureaplasma parvum* i *Ureaplasma urealyticum*) wykazują specyficzne cechy jak brak ściany komórkowej, uproszczony metabolizm, niewielkie rozmiary komórek i kolonii, oraz wewnątrzkomórkowe pasożytnictwo. W określaniu ich lekowrażliwości znalazły zastosowanie jedynie metody rozcieńczeniowe lub inkorporacji leku do agaru.

Celem pracy było określenie wrażliwości ureaplazm na wybrane chemioterapeutyki należące do 3 grup wykorzystywanych w postępowaniu klinicznym tj. makrolidów, tetracyklin i chinolonów.

Oznaczenie wartości MIC przeprowadzono dla 39 szczepów *U. parvum* (*Up*) i 26 szczepów *U. urealyticum* (*Uu*) izolowanych klinicznie

W badaniach zastosowano doksycyklinę, azytromycynę oraz lewofloksacynę. Na azytromycynę wrażliwsze okazały się szczepy *U. urealyticum*, przy czym wartość $MIC_{90} = 1 \mu\text{g/ml}$ dla obu gatunków oznacza, że niewiele szczepów (i tylko w przypadku *U. parvum*) jest opornych. Na doksycyklinę wrażliwsze były szczepy *U. parvum*, a zakresy MIC oznaczają, że nie ma szczepów opornych wśród obu gatunków bakterii. W przypadku lewofloksacyny natomiast dla obu gatunków ureaplazm stwierdzono duży zakres MIC z wartościami oznaczającymi oporność.

Podsumowanie: Doksycyklina jest dobrym wyborem w empirycznym leczeniu zakażeń o etiologii ureaplazmowej. W przypadku makrolidów wskazane jest stosowanie wyższych dawek leku, gdyż przy niższych istnieje ryzyko niepowodzenia klinicznego. Fluorochinolony nie powinny być stosowane w empirycznym leczeniu zakażeń mykoplazmowych.

Słowa kluczowe: *ureaplasma*, MIC, chemioterapia

ABSTRACT

The aim of the study was to determine susceptibility of ureaplasmas for selected antimicrobials belonging to 3 groups, which are applied clinically. Study was conducted on 39 *U. parvum* and 26 *U. urealyticum* clinical isolates. Doxycycline, azithromycin and levofloxacin were applied during the study.

In case of azithromycin *U. urealyticum* strains were more susceptible; $MIC_{90} = 1 \mu\text{g/ml}$ and MIC range for both species mean that only a few strains are resistant (only *U. parvum*). In case of doxycycline *U. parvum* strains were more susceptible and MIC ranges mean that there are no resistant strains in both species. In case of levofloxacin wide MIC range with values signifying resistance was found. Doxycycline is a good choice for empirical treatment of infections with ureaplasma aetiology. In case of macrolides higher dosage is indicated, because there is a risk of clinical failure at lower doses. Quinolones should not be used in empirical treatment of ureaplasma infections.

Key words: *ureaplasma*, MIC, chemotherapy

WSTĘP

Ureaplazmy stanowią jeden z dwóch rodzajów należących do rodziny *Mycoplasmataceae*, a zwanych potocznie mykoplazmami. Drobnoustroje te charakteryzują się niewielkimi rozmiarami zarówno komórek (około 0,3 μm średnicy), jak i kolonii (od 100 do 500 μm), a także uproszczonym metabolizmem (redukcja wielu szlaków, m.in. nie są w stanie wytwarzać kwasów tłuszczowych), co jest wyrazem ich niewielkiego genomu. Nie posiadają też ściany komórkowej. Konsekwencją jej braku jest naturalna oporność na β -laktamy, a także duża plastyczność, a więc i zmienność kształtów komórek.

Te fakultatywne beztlenowce (mikroaerofilne) słabo namnażają się *in vitro*. Rosną powoli, a pierwsze kolonie na agarze mogą pojawiać się dopiero po 7 dniach inkubacji. Mają też duże wymagania odżywcze. Wykazują wysokie powinowactwo do nabłonków i mogą bytować w ludzkim organizmie jako saprofity wewnątrz lub zewnątrzkomórkowe.

Obecnie znanych jest 14 serotypów ureaplazm grupowanych w 2 gatunki (biowary), które można zidentyfikować tylko metodami molekularnymi. Pierwszy z gatunków to *Ureaplasma parvum* (Parvo biovar, biovar 1 lub B) do którego przynależą serotypy 1, 3, 6, 14. Natomiast do drugiego gatunku *Ureaplasma urealyticum* (Biovar T 960, biovar 2 lub A) należą serotypy 2, 4, 5, 7-13.

W ludzkich drogach moczowo-płciowych *U. parvum* występuje 4 razy częściej niż *U. urealyticum*. W ponad 1/3 przypadków zakażeń wykrywany jest więcej niż 1 serotyp. Gatunki różnią się wirulencją i patogennością („*prostatitis-specific biovar*”, „*NGU-specific biovar*”).

Chorobotwórczość ureaplazm obejmuje: stany zapalne dróg moczowo-płciowych, zaburzenia funkcji reprodukcyjnych takie jak: uszkodzenia nasienia, obniżenie ruchliwości plemników, przedwczesne pęknięcie błon płodowych, zakażenia układu oddechowego noworodków oraz stany zapalne stawów (1).

Ze względu na specyficzne cechy tych drobnoustrojów w określaniu ich lekowrażliwości nie znalazła zastosowania metoda dyfuzji krążkowej, a jedynie metody rozcieńczeniowe lub inkorporacji leku do agaru. Toteż wiele zakażeń mykoplazmowych leczonych jest empirycznie, pomimo że wśród mykoplazm, podobnie jak w innych grupach bakterii, obserwuje się zjawisko oporności na leki (2). W leczeniu zakażeń mykoplazmowych stosowane są tylko chemioterapeutyki należące do makrolidów, tetracyklin i chinolonów.

Celem pracy było określenie wrażliwości ureaplazm na wybrane chemioterapeutyki należące do 3 różnych grup aby ułatwić lekarzom klinicytom dobór właściwego leku.

MATERIAŁ I METODY

MIC określono dla 39 szczepów *U. parvum* (*Up*) i 26 szczepów *U. urealyticum* (*Uu*) izolowanych klinicznie. Materiały uzyskane do badania pochodziły od kobiet z zakażeniami dróg moczowo-płciowych oraz noworodków z zakażeniami dróg oddechowych, a także dla wzorcowych szczepów każdego gatunku.

Oznaczenie wartości MIC przeprowadzano mikrometodą na 96-dołkowych płytkach W badaniach zastosowano doksycyklinę (Sigma); azytromycynę oraz lewofloksacynę (Fluka-Biochemika). Dla każdego badanego szczepu używano inokulum 100 CCU/ml (jednostka zmieniająca barwę podłoża - z ang. *colour changing unit*)

Zastosowano stężenia: 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$. W badaniu wrażliwości na chemioterapeutyki wykorzystano zdolność ureaplazm do rozkładania mocznika.

Szczepy ureaplazm izolowano metodą hodowli na podłożach płynnych i stałych PPLO wg *Hayflicka* (3). Identyfikacji gatunkowej ureaplazm dokonywano metodą PCR wykorzystując 2 pary primerów swoistych dla genu ureazy *Uu* i *Up* opisanych wcześniej wraz z warunkami amplifikacji (4). Kontrolę dodatnią stanowiło DNA szczepów wzorcowych *Uu* i *Up* (ATCC 27816 i 27815).

Detekcję produktu PCR przeprowadzano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Prażki uwidaczniiano w świetle UV.

WYNIKI

Na azytromycynę wrażliwsze okazały się szczepy *U. urealyticum* (zakres MIC od 0,05 do 2 [$\mu\text{g}/\text{ml}$], MIC_{50} = 0,25 [$\mu\text{g}/\text{ml}$] i MIC_{90} = 1 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]) w porównaniu do szczepów *U. parvum* (zakres MIC od 0,05 do > 64 [$\mu\text{g}/\text{ml}$], MIC_{50} = 0,5 [$\mu\text{g}/\text{ml}$] i MIC_{90} = 1 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]). Wartość MIC_{90} = 1 [$\mu\text{g}/\text{ml}$] dla obu gatunków oznacza, że niewiele szczepów jest opornych na azytromycynę (i tylko w przypadku *U. parvum* — co wynika z zakresu MIC). Na doksycyklinę wrażliwsze były szczepy *U. parvum* (zakres MIC od 0,05 do 4 [$\mu\text{g}/\text{ml}$], MIC_{50} = 0,5 [$\mu\text{g}/\text{ml}$] i MIC_{90} = 1 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]) niż *U. urealyticum* (zakres MIC od 0,05 do 8 [$\mu\text{g}/\text{ml}$], MIC_{50} = 0,5 [$\mu\text{g}/\text{ml}$] i MIC_{90} = 1 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]). Zakresy MIC oznaczają, że nie ma szczepów opornych na doksycyklinę wśród obu gatunków bakterii. Natomiast w przypadku lewofloksacyny dla obu gatunków ureaplazm stwierdzono duży zakres MIC z wartościami oznaczającymi oporność - dla obu gatunków wartości MIC mieściły się w zakresie od 0,05 do > 64 [$\mu\text{g}/\text{ml}$], MIC_{50} = 1 [$\mu\text{g}/\text{ml}$] i MIC_{90} = 2 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]. Wartości MIC_{50} i MIC_{90} wskazują na niemały odsetek szczepów opornych.

DYSKUSJA

Problem wrażliwości mykoplazm na antybiotyki pozostaje nadal kontrowersyjny (5-8). Wielu badaczy uważa, iż wrażliwość ta nie ulega zmianom, toteż lekarze stosują empirycznie do leczenia zakażeń mykoplazmowych przeważnie tetracykliny (7, 8). Wieloletnie doświadczenia własne potwierdzają spostrzeżenia innych autorów o częstszym izolowaniu opornych szczepów mykoplazm zwłaszcza od osób wcześniej leczonych antybiotykami (8, 10, 11).

W badaniu lekowrażliwości zastosowano leki, o których wiadomo, że są aktywne w stosunku do tej grupy drobnoustrojów oraz są stosowane w praktyce. Eradykacja mykoplazm z zakażonego organizmu może być trudna nie tylko z powodu oporności na lek, ale także z powodu wnikania tych patogenów do komórek eukariotycznych. Uproszczona budowa, niewielka liczba szlaków metabolicznych, zdolność do przekazywania sobie genów oporności oraz wewnątrzkomórkowe pasożytnictwo - wszystko to sprawia, że zestaw chemioterapeutyków stosowanych w zakażeniach mykoplazmowych jest stosunkowo wąski i może ulegać dalszym ograniczeniom.

Dlatego też istotny jest właściwy dobór leków stosowanych empirycznie, aby zapewnić skuteczność kliniczną (4-7). Nasze wyniki wskazują, że preferowana w Polsce doksycyklina pozostaje najlepszym wyborem, ponieważ oporność wśród mykoplazm jest na nią najniższa. Wysoką wrażliwość na doksycyklinę stwierdzali również inni badacze (1, 11). Zalecane powszechnie do leczenia makrolidy (jak azytromycyna) także mogą być stosowane, ale należy się liczyć z większym ryzykiem niepowodzeń klinicznych z powodu narastania oporności. Natomiast sytuacja jest odmienna w przypadku równie chętnie stosowanych w Polsce fluorochinolonów. Wyniki naszych badań wskazują, że oporność na fluorochinolony jest znaczącym problemem wśród mykoplazm — szczególnie, jeśli uwzględni się, że badana przez nas lewofloksacyna stanowi jeden z najaktywniejszych fluorochinolonów w stosunku do mykoplazm, a zgodnie z piśmiennictwem aktywność cyprofloksacyny i ofloksacyny jest zdecydowanie niższa (4, 5, 6, 9). O niskiej skuteczności cyprofloksacyny donoszą też inni autorzy (12, 13). Ponadto popularna w Polsce cyprofloksacyna jest niezbyt skuteczna klinicznie w zakażeniach chlamydiovych (14). Należy też zwrócić uwagę na to, że oporność na fluorochinolony narosła w ciągu ostatnich 5 lat (6, 9). W pracy *H. Cahana* i wsp. z 2003 r. stwierdzano powszechną wrażliwość na te chemioterapeutyki, podczas gdy w pracy *N. Kechagia* i wsp. z 2008 r. wykazywano częstą oporność (6, 9). Dlatego też lek ten (jak również inne fluorochinolony) nie powinien być raczej stosowany w zakażeniach dróg moczowopłciowych drobnoustrojami atypowymi.

PODSUMOWANIE

1. Doksycyklina jest dobrym wyborem w empirycznym leczeniu zakażeń o etiologii ureaplazmowej.
2. W przypadku makrolidów (szczególnie azytromycyny) wskazane jest stosowanie wyższych dawek leku gdyż przy zastosowaniu niższych dawek istnieje ryzyko niepowodzenia klinicznego.
3. Stosowanie fluorochinolonów (szczególnie popularnej w Polsce cyprofloksacyny) w empirycznym leczeniu zakażeń ureaplazmowych niesie ze sobą wysokie ryzyko niepowodzenia klinicznego.

PIŚMIENNICTWO

1. Waites K, Katz B, Shelonka R. Mycoplasmas as Neonatal Pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2005, 18:757-789.
2. Abele-Horn M, Wolff C, Dressel P i in. Association of *Ureaplasma urealyticum* biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients, and gynecological patients with pelvic inflammatory disease *J Clin Microb* 1997,35, 1199.
3. Hayflick L. The Mycoplasmatales and the L-phase of bacteria. New York: Meredith Corporation, 1965.
4. Biernat-Sudolska M, Rojek-Zakrzewska D, Lauterbach R. Assessment of various diagnostic methods of ureaplasma respiratory tract infections in newborns. *Acta Biochem Pol* 2006; 53: 3, 609-612.
5. Kenny GE, Cartwright FD. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *M. pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to GAR-936, dalbopristin, dirithromycin, evernimicin, gatifloxacin, linezolid, moxifloxacin, quinupristin-dalbopristin, and telithromycin compared to their susceptibilities to reference macrolides, tetracyclines, and quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2604-2608.
6. 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 (1-2): 39-43.
7. Karabay O, Topcuoglu A, Kocoglu E i in. Prevalence and antibiotic susceptibility of genital *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in a university hospital in Turkey. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2006; 33(1): 36-38.
8. Biernat-Sudolska M, Rojek-Zakrzewska D, Drzewiecki A, Lauterbach R. Wrażliwość na antybiotyki i chemioterapeutyki *Ureaplasma urealyticum* i *Ureaplasma parvum* izolowanych od noworodków z zaburzeniami oddechowymi. *Przegl Epidemiol* 2007; 61(2):371-6.
9. Kechagia N, Bersimis S, Chatzipanagiotou S: Incidence and antimicrobial susceptibilities of genital mycoplasmas in outpatient women with clinical vaginitis in Athens, Greece. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62(1): 122-125.
10. Biernat-Sudolska M. Zakażenia dróg moczowopłciowych bakteriami z rodziny Mycoplasmataceae.

Rozprawa doktorska, Wydział Lekarski CM UJ, Kraków 2001.

11. Taylor-Robinson D, Bebear C. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. *J. Antimicrobial Chemother* 1997, 40:622-630.
12. Bakalova LA, Akovbian VA, Bednova VN. Ciprofloxacin in the treatment of urogenital infections in women. *Antibiot Kimioter.* 1997:42-45.
13. Felmingham D, Robbins MJ, Ingley K. In vitro activity of trovafloxacin, a new fluorochinolone, against recent clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 1997, 39 suppl. B, 43.
14. Smelov V, Perekalina T, Gorelov A i in. *In vitro* activity of fluoroquinolones, azithromycin and doxycycline against *Chlamydia trachomatis* cultured from men with chronic lower urinary tract symptoms. *Eur Urol* 2004; 46: 647–650.

Otrzymano: 22.12.2008 r.

Zakwalifikowano do druku: 27.12.2008 r.

Adres do korespondencji:

dr n. biol. Małgorzata Biernat-Sudolska
Zakład Wirusologii Katedra Mikrobiologii Collegium
Medicum UJ
ul. Czysza 18, 31-121 Kraków,
tel. 012/634-54-00;
e-mail: msudolsk@cm-uj.krakow.pl