

14. Antao V. C., Hausdorff W. P. Global epidemiology of pneumococcal disease-new prospects for vaccine control. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009, 634: 19-29.

15. Old C. Bacterial adherence. *Med. Lab. Ski.* 1985, 42: 78-85.

Поступила 18.06.13

Контактная информация: Холодок Галина Николаевна, к.м.н.,
680022, Хабаровск, ул. Воронежская, 49, корп.1, р.т. (4212)73-78-56

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

Т.А.Иванова¹, А.Е.Гущин¹, Н.А.Гамова², О.И.Бархатова², И.В.Раковская²

ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЕНИТАЛЬНЫХ МИКОПЛАЗМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДОВ

¹Центральный НИИ эпидемиологии, ²НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

Цель. Установление соотношений, которые позволят производить пересчет концентраций микоплазм из КОЕ/мл или ЦОЕ/мл в единицы, получаемые при анализе методом ПЦР — ГЭ/мл. **Материалы и методы.** Чистые культуры *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* и *Ureaplasma urealyticum* исследовали культуральным и молекулярно-биологическим методами с количественной оценкой. Проводили исследование как исходных культур, так и серий десятикратных разведений. Всего проведено 32 эксперимента. **Результаты.** Соотношение между ГЭ/мл и КОЕ/мл для *M. hominis* составило 3,5; отношение ГЭ/мл и ЦОЕ/мл — 4,4. Отношение между ГЭ/мл и ЦОЕ/мл для *U. parvum* составило 7,1; для *U. urealyticum* — 11,2. **Заключение.** Установлены соотношения между показателями, получаемыми при количественными исследованием чистых культур генитальных микоплазм с использованием двух методов.

Журн. микробиол., 2014, № 2, С. 25—29

Ключевые слова: генитальные микоплазмы, *U. parvum*, *U. urealyticum*, *M. hominis*, ПЦР в режиме реального времени

Т.А.Иванова¹, А.Е.Гущин¹, Н.А.Гамова², О.И.Бархатова², И.В.Раковская²

MEASUREMENT OF GENITAL MYCOPLASMA CONCENTRATION BY USING A MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR-BIOLOGICAL METHODS

¹Central Research Institute of Epidemiology, ²Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Aim. Establishment of ratios that would allow to execute recalculation of mycoplasma concentration from CFU/ml and/or CCU/ml into units obtained during PCR analysis — geq/ml. **Materials and methods.** Pure cultures of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* were studied by cultural and molecular-biological methods with quantitative evaluation. Studies of initial cultures as well as series of 10-fold dilutions were carried out. 32 experiments in total were carried out. **Results.** Ratio between geq/ml and CFU/ml for *M. hominis* was 3.5; geq/ml and CCU/ml ratio — 4.4. Ratio between geq/ml and CCU/ml for *U. parvum* was 7.1; for *U. urealyticum* — 11.2. **Conclusion.** Ratios between indexes obtained during quantitative study of pure genital micoplasma cultures by using 2 methods were established.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2014, No. 2, P. 25—29

Key words: genital mycoplasma, *U. parvum*, *U. urealyticum*, *M. hominis*, PCR-RT

ВВЕДЕНИЕ

Ureaplasma parvum, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium* и *Mycoplasma hominis* — представители класса Mollicutes, объединенные в группу генитальных микоплазм в связи со способностью участвовать в развитии патологических процессов в органах уrogenитального тракта. *M. genitalium* в настоящее время рассматривается как облигатно патогенный микроорганизм; *U. parvum*, *U. urealyticum* и *M. hominis* — как условно патогенные микроорганизмы. Важно отметить, что *U. parvum*, *U. urealyticum* и *M. hominis* обнаруживают как во влагалищном отделяемом здоровых женщин, так и в составе полимикробных ассоциаций при развитии бактериального вагиноза. По данным литературы, частота обнаружения *U. parvum* во влагалищном отделяемом здоровых женщин составляет 27 — 57%, *U. urealyticum* — 17 — 32%, *M. hominis* — 12 — 60% [3, 8, 12, 13]. Ряд авторов показали, что *U. parvum*, *U. urealyticum* и *M. hominis* причастны к развитию таких осложнений как преждевременные роды, хориоамнионит, послеродовой/постабортный сепсис и др. Кроме того, описаны случаи выделения одной из генитальных микоплазм как единственного возбудителя абсцесса головного мозга, пневмонии, медиастинита, перикардита, эндокардита, остеита, артрита, раневой инфекции [6, 7, 9 — 11, 14]. Накопленный опыт позволяет говорить об *U. parvum*, *U. urealyticum* и *M. hominis* как об условно патогенных микроорганизмах, активизация патогенных свойств которых происходит при определенных до конца не изученных условиях.

Для обнаружения условно патогенных генитальных микоплазм в клиническом материале в настоящее время используют микробиологический посев и ПЦР.

С помощью микробиологического метода можно количественно определить содержание микоплазм в клиническом материале и выразить его в КОЕ/мл или ЦОЕ/мл. Последнее основано на способности уреоплазм разлагать мочевины, а *M. hominis* — аргинин, что приводит к повышению рН и изменению цвета индикатора в среде. Недостатками микробиологического метода является длительность исследования (3 — 4 суток) и неспособность некоторых штаммов расти в бесклеточной среде.

Важно отметить, что обнаружение ДНК методом ПЦР в отделяемом органов уrogenитального тракта без количественной оценки не имеет клинического значения, так как генитальные микоплазмы достаточно часто присутствуют в низких концентрациях у здоровых лиц в отсутствие воспаления [1]. В связи с этим, ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с количественной оценкой получает все большее распространение для диагностики состояний, ассоциированных с наличием генитальных микоплазм.

Сложившаяся ситуация диктует необходимость установления корреляции указанных методов, т.е. соотношений (коэффициентов), которые позволят производить пересчет концентраций микоплазм из привычных для многих клиницистов КОЕ/мл или ЦОЕ/мл в единицы, получаемые при ПЦР-анализе (геномные эквиваленты в мл, ГЭ/мл).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в системе *in vitro* с чистыми культурами микоплазм. В работе использовали *U. urealyticum* 8 серотипа и *U. parvum* 1 серотипа (были получены из Denmark FAO/WHO Collab. Centre for Animal Mycoplasmas в 1982 г.), *M. hominis* H34 (был получен в 1967 г. из Lister Inst. of Preventive Medicine, London C.W.I). Для всех экспериментов использовали культуры, замороженные в логарифмической фазе роста. Из каждой пробирки производили отбор аликвот для проведения исследования с помощью культурального метода и ПЦР-РВ с коли-

чественной оценкой микроорганизмов в полученном материале. Для всех культур алиquotы титровали в десятикратных разведениях до двух отрицательных разведений. В каждом разведении определяли количество микоплазм, выраженное в КОЕ/мл (для *M. hominis*), ЦОЕ/мл (для всех исследуемых микоплазм) и ГЭ/мл (ПЦР-РВ) (для всех исследуемых микоплазм).

Для культивирования *U. parvum* и *U. urealyticum* использовали среду Difco PPLO Broth, обогащенную сывороткой крови лошади (20%), дрожжевым экстрактом (2,5%), мочевиной (0,05%), феноловым красным (0,003%), пенициллином (1000 ед/мл); pH 5,8 — 6,2. Среда для *M. hominis* — среда Difco PPLO Broth, обогащенная экстрактом свежих пекарских дрожжей, нативной сывороткой лошади (конечная концентрация 20%), аргинином в конечной концентрации 1%, феноловым красным в концентрации 0,003% и пенициллином (500 ЕД/мл) [2].

Для проведения ПЦР использовали набор АмплиСенс-ФлороЦеноз-Микоплазмы-FL (ЦНИИ эпидемиологии, Москва), для выделения ДНК из материала — набор ДНК-Сорб-АМ (ЦНИИ эпидемиологии, Москва). Экстракцию ДНК производили из 100 мкл исходного материала, в реакцию амплификации брали 10 мкл очищенной ДНК. Полученные количественные значения пересчитывали на 1 мл для сопоставления с результатами культурального исследования.

После проведения лабораторных исследований получали соотношение между показателями, выраженными в ГЭ/мл, КОЕ/мл и ЦОЕ/мл.

Полученные результаты сопоставляли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism, версия 4.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты серий проведенных экспериментов хорошо согласовывались между собой. Концентрации исследуемых микроорганизмов в исходных культурах (типичный опыт из более 30 проведенных) составляли для *U. parvum*: 1×10^6 ЦОЕ/мл и 5×10^6 ГЭ/мл; для *U. urealyticum*: 1×10^6 ЦОЕ/мл и $8,6 \times 10^6$ ГЭ/мл; для *M. hominis*: 2×10^5 КОЕ/мл, 1×10^5 ЦОЕ/мл и $4,4 \times 10^5$ ГЭ/мл.

В каждом опыте измеряли концентрацию *M. hominis* в каждом разведении культуральным методом и ПЦР-РВ. Далее получали соотношение концентраций, полученных в ГЭ/мл, КОЕ/мл и ЦОЕ/мл.

По данным всех проделанных опытов (всего более 10) соотношение (коэффициент) между ГЭ/мл и КОЕ/мл по всем разведениям для *M. hominis* составило 3,5; отношение ГЭ/мл и ЦОЕ/мл — 4,4 (рис. 1). Это означает, что концентрации, получаемые в ГЭ/мл, превышают концентрации, получаемые в КОЕ/мл и в ЦОЕ/мл в 3,5 и 4,4 раза соответственно (ГЭ/мл > КОЕ/мл, ЦОЕ/мл), т.е. разница составляет менее одного порядка. Важно отметить, что во всех точках зна-

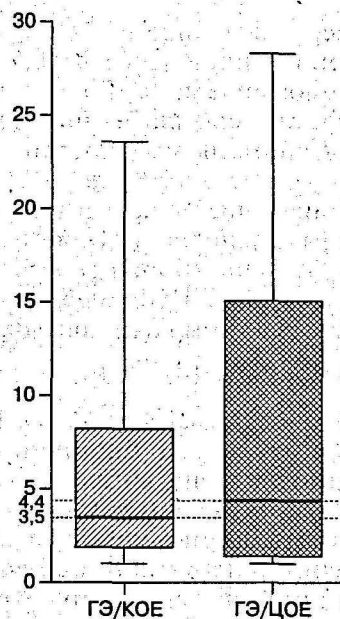


Рис. 1. Значение соотношения между ГЭ/мл и КОЕ/мл; ГЭ/мл и ЦОЕ/мл для *M. hominis* в проведенных экспериментах.

Представлены медиана (пунктирная линия), верхний и нижний квартили, минимальное и максимальное значения отношения ГЭ/КОЕ и ГЭ/ЦОЕ.

чение, полученное в ГЭ/мл, превышало значение, полученное в КОЕ/мл/ЦОЕ/мл.

Отношение между ГЭ/мл и ЦОЕ/мл для *U. parvum* составило 7,1 (рис. 2). Таким образом, определяемые показатели в ЦОЕ/мл были меньше показателей в ГЭ/мл в 7 раз.

Отношение между ГЭ/мл и ЦОЕ/мл по всем разведениям для *U. urealyticum* составило 11,2 (рис. 2). Таким образом, полученные значения в ЦОЕ/мл были меньше показателей в ГЭ/мл на 1 порядок.

ОБСУЖДЕНИЕ

В работе Abele-Horn M. et al [5] были получены данные, на основании которых исследователи пришли к выводу, что патогенный эффект микоплазм может зависеть от плотности обсемененности ими слизистых урогенитального тракта, в связи с чем количественная оценка данного микроорганизма в биологическом материале принципиальна для построения тактики ведения пациентов, а также прогнозирования риска перехода преморбидных состояний в патологические.

В настоящее время принято считать, что присутствие микоплазм в титре 10^4 КОЕ (ЦОЕ)/мл и выше в отделяемом урогенитального тракта является диагностически значимым, т.к. их часто обнаруживают в уретре/влагалище здоровых людей в более низких и пограничных концентрациях [4].

В последнее время с развитием молекулярно-биологических технологий в лабораторной практике все чаще стали использовать ПЦР-РВ, позволяющую определять не только наличие ДНК микроорганизмов, но и ее концентрацию в биоматериале, что, в свою очередь, отражает плотность обсемененности слизистых урогенитального тракта исследуемыми микроорганизмами. Это сделало возможным более эффективное применение ПЦР для выявления условно патогенных микроорганизмов, в том числе, генитальных микоплазм.

Основной задачей проведенного исследования было установление соотношений между концентрацией клеток генитальных микоплазм, определяемой культуральным методом и выраженной в КОЕ/мл и ЦОЕ/мл, и концентрацией ДНК, определяемой методом ПЦР-РВ с количественной оценкой. В научных исследованиях и лабораторной практике наиболее часто используют посев на жидкие питательные среды с индикаторами, и соответственно получаемые значения должны выражаться в ЦОЕ/мл. Подсчет КОЕ на чашках для *U. parvum* и *U. urealyticum* представляет некоторые сложности в связи с малыми размерами колоний и необходимостью предварительной адаптации уреаплазм к агаровой среде. В связи с этим, в данной работе для уреаплазм определяли только показатели ЦОЕ/мл, а для *M. hominis* как КОЕ/мл, так и ЦОЕ/мл.

На практике по многим причинам (образование клеточных агрегатов, многоядерных нитчатых форм, нежизнеспособных клеток) показатель ГЭ/мл может быть несколько выше, чем КОЕ/мл или ЦОЕ/мл. Результаты нашей работы свидетельствуют о хорошей корреляции культурального метода и метода ПЦР-РВ и выявлении значимых для патологического процесса количественных показателей двумя методами.

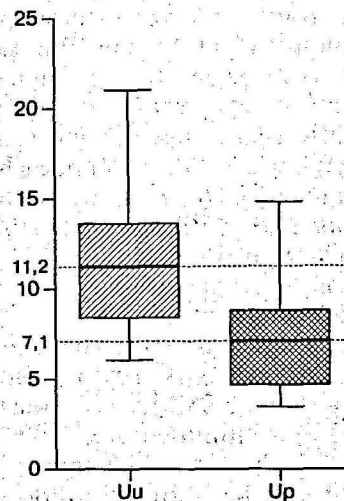


Рис.2. Значение соотношений между ГЭ/мл и ЦОЕ/мл для *U. parvum* и *U. urealyticum* в проведенных экспериментах.

Представлены медиана (пунктирная линия), верхний и нижний квартили, минимальное и максимальное значения отношения ГЭ/ЦОЕ.

При работе с чистой культурой значение концентрации 10^4 ЦОЕ/мл, установленное культуральным методом, соответствует примерно 4×10^4 ГЭ/мл, установленному методом ПЦР-РВ для *M. hominis*, коэффициент пересчета составляет 4. Для *U. parvum* и *U. urealyticum* значение концентрации 10^4 ЦОЕ/мл, установленное культуральным методом, соответствует примерно 10^5 ГЭ/мл, установленному методом ПЦР-РВ, коэффициент пересчета составляет 10.

Стоит отметить, что при работе с биологическим материалом, полученным от пациентов, может иметь место другая закономерность в связи с присутствием в материале ингибиторов — лизофосфолипидов, к которым бесстеночные микоплазмы очень чувствительны. И следовательно, результаты измерения концентрации, полученные при использовании культурального метода в лабораторной практике, могут оказаться несколько заниженными. Кроме того, микроорганизмы могут находиться в разных состояниях и разных фазах роста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитриев Г.А. Лабораторная диагностика бактериальных урогенитальных инфекций. М., Мед. книга, 2007.
2. Лабинская А.С., Костюкова Н.Н., Иванова С.М. Руководство по медицинской микробиологии. М., Бином, 2010.
3. Савичева А.М., Башмакова М.А., Новикова Л.Н. и др. Микоплазмы и микоплазменные инфекции гениталий. ЗППП, 1996, 2: 28-33.
4. Савичева А.М., Прилепская В.Н., Соколовский Е.В., Кисина В.И., Гушин А.Е., Забинов К.И. Роль микоплазм в урогенитальной патологии женщин и их половых партнеров. Актуальные проблемы здравоохранения, 2008, LVII: 11-22.
5. Abele-Horn M., Scholz M., Wolff C., Kolben M. High-density vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization as risk factor for chorioamnionitis and preterm delivery. Acta Obstet. Gynecol. Scand. 2000, 79: 973-978.
6. Akonso-Vega C., Wauterus N., Vermeyken D. et al. A fatal case of *Mycoplasma hominis* meningoenfcefalitis in a full-term newborn. J. Clin. Microbiol. 1997, 35: 286-287.
7. Blasco M., Torres L., Marco M. et al. Prostetic valve endocarditis caused by *Mycoplasma hominis*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2000, 19: 638-640.
8. Falk L., Fredlund H., Jensen J. Signs and symptoms of urethritis and cervicitis among women with or without *Mycoplasma genitalium* or *Chlamydia trachomatis* infection. Sex. Transm. Infect. 2005, 81: 73-78.
9. Luttrell L., Kany S., Corey G. et al. *Mycoplasma hominis* septic arthritis: two case reports and review. Clin. Infect. Dis. 1994, 19: 1067-1070.
10. Lyon G., Alsbaugh F., Meredith F. et al. *Mycoplasma hominis* pneumonia complicating bilateral lung transplantation: case report and review of literature. Chest. 1997, 112: 1428.
11. Mattila P., Carlson P., Sevonen A. et al. Life-threatening *Mycoplasma hominis* mediastinitis. Clin. Infect. Dis. 1999, 29: 1529-1537.
12. Taylor-Robinson D. Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: an update. Clin. Infect. Dis. 1996, 23: 671-684.
13. Taylor-Robinson D., Furr P. Update on sexually transmitted mycoplasmas. Lancet. 351: 12-15.
14. Zheng X., Olson D., Tully J. et al. Isolation of *Mycoplasma hominis* from brain abscess. J. Clin. Microbiol. 1997, 35: 992-994.

Поступила 18.06.13

Контактная информация: Иванова Татьяна Андреевна,
111123, Москва, ул. Новогиреевская, За, р.т. (495)974-96-46