

Л. Н. НОВИКОВА, А. Е. ТАРАСКИНА

НИИ акушерства и гинекологии
им. Д. О. Отта РАМН,
Санкт-Петербург

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА УРОГЕНИТАЛЬНОЙ МИКОПЛАЗМЕННОЙ КОЛОНИЗАЦИИ И ИНФЕКЦИИ

В работе представлены данные о возможностях определения урогенитальных микоплазм (*Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*) с помощью некоторых вариантов культурального и ПЦР методов. Приводится схема культуральных исследований в полном объеме, с помощью которой достигаются высокие показатели специфичности и чувствительности. Предложен алгоритм исследования для выявления *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*, основанный на использовании культурального и ПЦР методов как взаимодополняющих.

Введение

Микоплазмы относятся к самостоятельному классу микроорганизмов Mollicutes, занимающих по уровню структурной организации клеток промежуточное положение между бактериями и вирусами. В отличие от бактерий микоплазмы лишены клеточной стенки и не способны синтезировать ее биохимические предшественники. В отличие от вирусов микоплазмы содержат две нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), хотя по размеру клеток они сопоставимы с крупными вирусами. Минимальное количество генетической информации, имеющееся у микоплазм, определяет их зависимость от клеток высших организмов. Поэтому они приспособились к тесному сосуществованию с этими клетками, паразитируя не только на их мембранах, но и локализуясь внутриклеточно [10, 12].

У человека встречаются 15 видов микоплазм, которые заселяют главным образом поверхности слизистых оболочек урогенитального и респираторного трактов. К урогенитальным обычно относят 5 видов микоплазм: *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma penetrans*. Среди этих 5 видов, обнаруживаемых при урогенитальных инфекциях, 2 встречаются наиболее часто — *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*) и *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*), остальные встречаются сравнительно редко [1, 5].

Широкое распространение урогенитальных микоплазм и частое выявление их у практически здоровых лиц затрудняет решение

вопроса о роли этих микроорганизмов в этиологии и патогенезе заболеваний урогенитального тракта. Некоторые исследователи относят микоплазмы к абсолютным патогенам, ответственным за развитие многих нозологических форм. Другие склоняются к тому, что микоплазмы являются комменсалами урогенитального тракта, способными при определенных условиях чаще в ассоциации с другими микроорганизмами вызывать инфекционно-воспалительные процессы мочеполовых органов [1, 2].

Несмотря на то, что урогенитальные микоплазмы относятся к условно патогенным, они способны вызывать выраженные патологические изменения воспалительного характера с формированием длительно персистирующей инфекции, которой нередко присуще бессимптомное, торпидное течение с выраженными аутоиммунными осложнениями [8, 12]. Доказана этиологическая роль микоплазм при таких патологических процессах, как хронические «неспецифические» заболевания урогенитального тракта — простатит, вагинит, пиелонефрит и т.п. [3, 4, 6, 13]. Микоплазменная инфекция нередко приводит к осложнениям течения беременности и представляет потенциальную угрозу для плода и новорожденного [5, 7].

Широкая распространенность, трудность диагностики и неадекватность проводимой терапии привели в настоящее время к преобладанию микоплазменных инфекций над «классическими» венерическими заболеваниями [1]. Ввиду отсутствия специфической клинической картины собственно микоплазменных инфекций и частого



бессимптомного носительства этих микроорганизмов, данные микробиологических исследований существенно помогают, но все же не являются определяющими в решении вопросов этиологии инфекционного процесса. Одновременное выявление других патогенных и условно патогенных микроорганизмов осложняет оценку позитивных результатов в отношении урогенитальных микоплазм. При этих обстоятельствах остается актуальным вопрос о разработке адекватных методов определения этих микроорганизмов, которые обеспечивали бы наиболее объективные данные не только о наличии микоплазм, но и об их количестве в исследуемых клинических материалах [2].

Среди методов лабораторной диагностики микоплазменной урогенитальной инфекции наиболее надежными считаются культуральные, обеспечивающие возможность выделения и видовой идентификации микоплазм, а также установления количества микоплазм в образце [1, 2].

Культуральная диагностика микоплазменных инфекций осуществляется с помощью посевов клинических образцов в жидкие и на плотные питательные среды. Стандартные стадии анализа при использовании культурального метода включают в себя взятие образца у пациента и помещение в жидкую питательную или транспортную среду и дальнейшее исследование инокулированных образцов (инкубация посевов в термостате, оценка ферментативной активности, видовая идентификация). Жидкие среды, разработанные для выделения урогенитальных микоплазм, содержат необходимые для роста микроорганизмов вещества — триптический перевар сердечной мышцы крупного рогатого скота или плацент, пептон, дрожжевой экстракт, лошадиную сыворотку, специфические субстраты (мочевина для *U. urealyticum* и аргинин для *M. hominis*) и индикатор (феноловый красный или бромтимоловый синий). Рост соответствующего вида микоплазм определяется по изменению pH среды

в щелочную сторону и соответственно изменению цвета бульона. Введенные в состав питательных сред антибиотики пенициллинового ряда и противогрибковые препараты, к которым устойчивы микоплазмы, обеспечивают селективность сред, подавляя рост другой микрофлоры, контаминирующей исследуемые образцы. Идентификация урогенитальных микоплазм на плотных средах основывается на их способности давать на специальных обогащенных агарх морфологически характерные колонии. При этом *M. hominis* образуют колонии размером 100–300 мкм главным образом в виде «яичницы-глазуньи», *U. urealyticum* вырастают в виде колоний, похожих на «морских ежей» размером 10–50 мкм. Колонии *M. hominis* на агаре хорошо видны при малом увеличении микроскопа без окраски, колонии *U. urealyticum* из-за маленьких размеров требуют окрашивания с помощью сульфата марганца, который, окисляясь под действием уреазы, продуцируемой уреоплазмами, придает им темно-коричневый цвет.

В последние годы получили широкое распространение молекулярно-биологические методы, в частности полимеразная цепная реакция (ПЦР). Суть данного метода заключается в обнаружении генетического материала (ДНК или РНК) микроорганизмов в клинических образцах с помощью реакции, которая позволяет за короткое время увеличить количество специфической последовательности ДНК в миллионы раз. Для ее осуществления используются два праймера, фланкирующих специфическую для вида микоплазм последовательность нуклеотидов и ориентированных в направлении 5'→3'. Эти праймеры гибридизируются с противоположными нитями ДНК, и при добавлении ДНК-полимеразы синтез ДНК идет на обеих нитях между праймерами. Успех конкретной ПЦР существенно зависит от правильного выбора и качества праймеров, которые должны соответствовать целому ряду требований, обеспечивающих надежную идентификацию микроорга-

низмов. Ввиду высокой чувствительности ПЦР выявляет присутствие очень небольшого количества урогенитальных микоплазм в исследуемых образцах [11].

Серологические методы, т.е. определение специфических антител ввиду ряда причин (широкая внутривидовая антигенная гетерогенность микоплазм, возможность присутствия гуморальных антител у клинически здоровых лиц) считаются приемлемыми лишь как скрининговые или дополнительные к культуральному или ПЦР методам [1].

Цель нашего исследования — оценка возможностей идентификации урогенитальных микоплазм (*M. hominis* и *U. urealyticum*) с помощью некоторых современных вариантов культурального и ПЦР методов.

Материалы и методы

Были исследованы клинические материалы, взятые у женщин (отделяемое влагалища) и мужчин (отделяемое уретры), проходивших обследование в Институте акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН. Культуральным методом исследовано 3000 клинических образцов и с помощью ПЦР—75.

При посевах применяли жидкие и плотные питательные среды, состав которых соответствовал общепринятым микробиологическим стандартам [6]. Схема культивирования урогенитальных микоплазм, разработанная в лаборатории микробиологии Института, предусматривала два этапа. На первом этапе клинический материал вносился в две жидкие (аргининовый и мочевиновый бульоны) и помещался на две плотные питательные среды с соответствующими для *M. hominis* и *U. urealyticum* селективными и дифференциальными свойствами (первичный посев). На втором этапе после 24–48-часового культивирования из жидких питательных сред осуществлялись высевы на соответствующие виду микроорганизма плотные среды. Подобная полная схема культуральных исследований была направлена на обнаружение минимальных

количеств микоплазм в анализируемом материале.

Результаты первичных посевов оценивались в интервале от 24 до 48 часов следующим образом. Отмечалось изменение цвета культуральных бульонов по сравнению с контрольными. При этом учитывалась не только степень опесчанивания сред, но и их мутность, указывающая на контаминацию бактериальной или грибковой флорой. В это же время чашки Петри с плотными питательными средами просматривались с использованием малого увеличения микроскопа (об. $\times 3,2$) для обнаружения выросших колоний микоплазм. Независимо от результатов анализа первичных посевов из всех бульонов производились высева на плотные питательные среды, и образцы продолжали культивировать еще 48 часов. Затем снова отмечалось состояние жидких питательных сред, и просматривались чашки Петри с агаром, на которые делались высева. Образцы, давшие рост на агаре в результате первичного посева, расценивались как содержащие $\geq 10^1$ КОЕ, а давшие рост колоний на агаре лишь в результате высева, как содержащие $\leq 10^1$ КОЕ (на тампон или на мл). Образцы, показавшие положительные реакции только в жидких питательных средах без роста на плотных, рассматривались как сомнительные.

Для оценки возможностей обнаружения уrogenитальных микоплазм методом ПЦР были использованы две ПЦР-системы (НТФ «Литех» НИИ физико-химической медицины МЗ РФ), отличающихся характером обработки образцов: сорбентный метод выделения ДНК (ПЦР-1) и пробоподготовка «ДНК-Экспресс» (ПЦР-2). Работа с диагностическими наборами проводилась строго в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к ПЦР-тестам. Для установления эффективности апробируемых реагентов все изучаемые клинические образцы были исследованы культуральным методом, результаты которого служили контролем.

С целью определения специфичности праймеров, используемых в исследуемых тест-системах, была проведена ПЦР с набором бактериальных культур для регистрации возможной перекрестной реакции с ДНК других представителей урогенитальной микрофлоры, наиболее часто встречающихся в клинических материалах. Были выбраны 20 клинических клонов бактериальных культур различной видовой принадлежности: *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus sp.*, *Listeria monocytogenes*, дрожжеподобные грибы рода *Candida*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Salmonella enteritidis* (zp.D), *Haemophilus influenzae*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Gardnerella vaginalis*.

Чувствительность и специфичность диагностических тестов оценивались по формулам, предложенным М.Домейка [9]:

$$\begin{aligned}\text{Чувствительность} &= \frac{\text{ИП}}{\text{ИП} + \text{ЛО}} \times 100\% \\ \text{Специфичность} &= \frac{\text{ИО}}{\text{ИП} + \text{ЛО}} \times 100\%\end{aligned}$$

(ИП — истинно положительный результат, ИО — истинно отрицательный результат, ЛП — ложноположительный результат, ЛО — ложноотрицательный результат).

Результаты и обсуждение

Из 3000 исследованных культуральным методом образцов *M. hominis* были обнаружены в 473 (15,8%), а *U. urealyticum* — в 1965 (65,5%). В клинических материалах, содержащих *M. hominis*, в большинстве случаев (98,5%) одновременно находили и *U. urealyticum*. Значимое число микоплазм $\geq 10^1$ КОЕ было обнаружено в 441 пробе с *M. hominis* (93,2%) и в 1151 образце с *U. urealyticum* (58,6%).

В табл. 1 представлены варианты, на которые по культураль-

ным данным распределились образцы в зависимости от того, на каком этапе анализа (первичный посев, высев) и на каких диагностических средах (жидкие, плотные) были получены сведения о присутствии в исследуемом материале *M. hominis* и/или *U. urealyticum*.

Большинство образцов, содержащих *M. hominis* (87,1%), давали рост на всех питательных средах в первичных посевах и в высевах из аргининового бульона (вариант 6), в то время как лишь треть (29,2%) образцов, содержащих *U. urealyticum*, могли быть отнесены к этой группе. Примерно в таких же количествах образцы, содержащие *U. urealyticum*, распределялись между вариантом 2 (рост в мочевином бульоне и на агаре при первичном посеве материала) — в 29,0% и вариантом 4 (рост в мочевином бульоне и на агаре после высева из бульона) — 27,9%. Значительно меньшее число образцов с *M. hominis*, отнесенное к этим двум вариантам (2 и 4), также обнаруживалось почти в равном соотношении — 4,0% и 3,8% соответственно.

Наблюдалось значительное преобладание случаев положительной реакции в мочевином бульоне (13,5%) по сравнению с числом положительных реакций в аргининовом бульоне (3,0%) без признаков роста *M. hominis* и/или *U. urealyticum* на соответствующих селективных агарах (вариант 1). При этом в большей части мочевино-положительных бульонов (196 из 266 — 74,1%) отмечалось помутнение среды, и в значительной части этих случаев наблюдался рост бактериальной микрофлоры на агаре до или после высева. Образцы подобного варианта в случаях с *M. hominis* (12 из 14) также показали помутнение бульона, и в некоторых (3) из них был также отмечен рост бактериальной флоры на микоплазменном агаре.

Остальные варианты (3 и 7), в которых микоплазмы, не проявив биохимической активности в бульонах, обнаруживались на плотных средах, встречались редко,

Результаты культивирования микоплазм на жидких и плотных питательных средах

Варианты роста		1 Б (+) ПА (-) ВА (-)	2 Б (+) ПА (+) ВА (-)	3 Б (-) ПА (+) ВА (-)	4 Б (+) ПА (-) ВА (+)	5 Б (-) ПА (-) ВА (+)	6 Б (+) ПА (+) ВА (+)	7 Б (-) ПА (+) ВА (+)	Σ
Вид микоплазм	<i>M. hominis</i>	14	19	8	18	—	412	2	473
	n	3,0	4,0	1,7	3,8	—	87,1	0,4	100,0
<i>U. urealyticum</i>	n	266	570	7	548	—	574	—	1965
	%	13,5	29,0	0,4	27,9	—	29,2	—	100,0

Б — бульон аргининовый (*M. hominis*) или мочевиновый (*U. urealyticum*)

ПА — первичный посев на агаре

ВА — высеив на агаре из бульонов

но несколько чаще для *M. hominis* (2,1%) по сравнению с *U. urealyticum* (0,4%).

По результатам культуральных исследований к истинно положительным были отнесены образцы, давшие рост микоплазменных колоний на агаре (все варианты со 2 по 7), и те из образцов 1-ой группы, которые в отсутствии роста микоплазм на плотных средах дали цветную реакцию в бульоне, не сопровождавшуюся помутнением. Таким образом, к истинно положительным были отнесены 461 образец с *M. hominis* и 1769 образцов с *U. urealyticum*. Остальные (12 с *M. hominis* и 196 с *U. urealyticum*) расценивались как сомнительные из-за сопутствующего роста бактериальной флоры. Рассчитанные на основании этих оценок показатели чувствительности и специфичности культурального метода, проведенного в полном объеме по определению *M. hominis* составили 98,7% и 98,1%, по определению *U. urealyticum* — 99,8% и 96,7%, соответственно. Как показывают эти расчеты, культуральный метод позволял достигать высоких значений чувствительности для обоих видов микроорганизмов, в то время как показатель специфичности в отношении *U. urealyticum* был несколько ниже по сравнению с показателем для *M. hominis*. Это объясняется главным образом более слабой селективной защитой уреоплазменных питательных сред от роста бактериальной и грибковой флоры, присутствующей в клинических образцах.

Набор антимикробных препаратов, используемых в составе питательных сред против роста этой флоры (к которым устойчивы сами микоплазмы) более разнообразен в средах для культивирования *M. hominis* по сравнению со средами для культивирования *U. urealyticum*.

Анализ данных показывает, что использование для культивирования урогенитальных микоплазм только жидких питательных сред (что нередко применяется в практике лабораторий) может явиться причиной значительной части ошибочных как «ложноположительных», так и «ложноотрицательных» результатов. Пренебрежение этапом высевов из микоплазменных бульонов в культуральном исследовании может привести к тому, что значительное число образцов (около 4 %, содержащих *M. hominis* и около 30 %, содержащих *U. urealyticum*) из однозначно положительных останутся в 1-й группе.

В целом результаты проведенных культуральных исследований показали, что этот метод позволяет достигать большой степени достоверности в выявлении урогенитальных микоплазм при условии выполнения полного объема двухэтапной схемы культурального исследования с использованием всех необходимых селективных питательных сред. Особенно важно выполнение всех этих требований исследования для *U. urealyticum*, так как жизнеспособность *U. urealyticum* *in vitro* значительно ниже, чем *M. hominis*, и для достиже-

ния порогового значения, приводящего к образованию колоний на агаре, этому виду микоплазм чаще требуется стадия предварительного накопления в бульоне.

Данные исследований по определению *M. hominis* и *U. urealyticum* с помощью ПЦР-наборов представлены в табл. 2. Обе ПЦР-1 и ПЦР-2 показали абсолютную специфичность по отношению к ДНК *M. hominis* (100,0%). Тест-система с пробоподготовкой «ДНК-Экспресс» обеспечивала такую же высокую специфичность (100,0%) при определении *U. urealyticum*, в то время как этот показатель при работе с помощью тест-системы с сорбентным методом выделения ДНК оказался на более низком уровне (83,9%). Тест-система ПЦР-2 обеспечивала и несколько более высокую чувствительность в отношении ДНК *M. hominis* (80,0%) по сравнению с ПЦР-1 (72,7%). Показатели чувствительности в отношении *U. urealyticum* по результатам работы обоих наборов оставался на одном уровне (76,1%).

Данные апробации ПЦР-тест-систем на бактериальных культурах показали абсолютную специфичность обеих реакций на *M. hominis*, ни в одной из которых не наблюдалось перекрестного взаимодействия праймеров с wybranнми бактериальными культурами. При определении *U. urealyticum* с помощью ПЦР-2 специфичность реакции оказалась также абсолютной, в то время как реакция в наборе ПЦР-1

Сравнительные результаты выявления ДНК методами ПЦР

Культуральный метод		M. hominis			U. urealyticum			
		+	—	±*	+	—	±*	Σ
ПЦР-1	+	10	—	—	24	5	10	75
	—	6	59	—	11	21	4	
Σ			75			75		
ПЦР-2	+	12	—	—	24	—	3	75
	—	4	59	—	11	26	11	
Σ			75			75		

* Неопределенный результат: наличие положительной реакции в жидких средах при отсутствии роста микроорганизмов на плотных средах

давала положительный сигнал на *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*.

Полученные данные по оценке 2-х различных ПЦР-тест-систем свидетельствуют о том, что обе они позволяют достигать удовлетворительных результатов. Однако по всем параметрам (чувствительность и специфичность) ПЦР-2 для выявления ДНК *M. hominis* и *U. urealyticum* несколько превосходила ПЦР-1.

При использовании любого лабораторного метода прогнозируется и допускается некоторая доля случаев, интерпретация результатов исследования которых в силу тех или иных причин затруднена. В таких ситуациях принято прибегать либо к повторному исследованию, либо к дополнительному применению других методов исследования в расчете на совпадение результатов, полученных разными способами. Данные нашей работы по оценке культурального и ПЦР методов указывают на то, что использование этих методов в дополнение друг к другу может способствовать получению наиболее точных результатов по определению урогенитальных микоплазм в клинических материалах. Такой подход уже осуществляется в работе нашей лаборатории следующим образом. Диагностика урогенитальных микоплазменных инфекций основывается на использовании культурального метода. В подав-

ляющем большинстве случаев культуральный метод позволяет получить не только однозначный ответ на вопрос о наличии в исследуемом материале микоплазм, но и судить об их количестве, что не обеспечивается другими методами, но является важным моментом вследствие условно-патогенного характера этих микроорганизмов. Метод ПЦР-2, как дающий наиболее удовлетворительные показатели чувствительности и специфичности, используется нами как вспомогательный в случаях, когда данные культуральной диагностики остаются неопределенными главным образом из-за присутствия большого количества бактериальной или грибковой флоры. В подобных ситуациях информация, полученная с помощью ПЦР, помогает окончательной интерпретации данных микробиологического исследования.

Таким образом, нами предлагается алгоритм исследования при выявлении урогенитальных микоплазм. В качестве основополагающего (скринингового) предлагается культуральный метод с определением количества микоплазм на 1 мл клинического материала (моча, эякулят) или на тампон (отделяемое влагалища, цервикального канала или уретры). В качестве дополняющих или подтверждающих в случаях неопределенного результата культурального исследования рационально применение ПЦР-метода.

Литература

1. Адаскевич В. П. Инфекции, передаваемые половым путем. — М., 1999. — 413 с.
2. Борисенко К. К., Тоскин И. А., Кисина В. И. О значении колонизации мочеполовых органов *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*. ИППП. — 1999. — № 3. — С. 28–32.
3. Козлова В. И., Пухнер А. Ф. Вирусные, хламидийные и микоплазменные заболевания гениталий. — М., 1995. — 317 с.
4. Мавров И. И. Половые болезни. — Киев, 2002. — 480 с.
5. Новикова Л. Н., Тараскина А. Е. Урогенитальные микоплазмы и репродуктивное здоровье женщины. Мат. XXXVI науч.-практ. конференции «Влияние ИППП на распространение ВИЧ-инфекции и репродуктивное здоровье населения». — СПб., 2001. — С. 43–44.
6. Прозоровский С. В., Раковская И. В., Вульфвич Ю. В. Медицинская микоплазмология. — М., 1995. — 288 с.
7. Савичева А. М., Башмакова М. А., Новикова Л. Н. Микоплазмы и микоплазменные инфекции гениталий. ЗППП. — 1996. — № 2. — С. 28–29.
8. Christiansen G., Jensen L. T., Boesen T., Emmersen J., S. A. Ladefoged, Li-K. Schiotz and Birkelund S. Molecular biology of *Mycoplasma*. Wien. Klin. Wochenschr. — 1997. — Vol. 109. — P. 557–561.
9. Domeika M. Diagnosis of genital chlamydial infection in humans as well as in cattle. Sweden, Uppsala — 1994. — P. 47.
10. Kenny G. E. *Mycoplasmas*. In Manual of clinical microbiology, Am. Society for microb. — 1991. — P. 478–482.
11. Mullis K. B., Faloora F. Methods Enzymol. — 1987. — Vol. 155. — P. 335–350.
12. Razin S., Yogeve D. And Naot Y. Molecular Biology and Pathogenicity of *Mycoplasmas*. Microbiol Mol Biol Rev Dec. — 1998. — Vol. 62. — N 4. — P. 1094–1156.
13. Taylor-Robinson D., Furr P. M. Genital mycoplasma infections. Wien Klin Wochenschr. — 1997. — Vol. 109. — N 14–15. — P. 578–583.