



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014114705/10, 11.04.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.04.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.04.2014

(45) Опубликовано: 20.06.2015 Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **РОКА ВИЛЬЧЕС ВАШИНГТОН, Разработка тест-систем для идентификации и определения антибиотикочувствительности возбудителей микоплазмоза: *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*, диссертация, Санкт-Петербург, 2005, с.5,8, 43-48, с.63-112, 129. БЕЗРУКОВ ВЛАДИСЛАВ МИХАЙЛОВИЧ, Изучение, разработка и стандартизация микротест-системы для выявления и идентификации уреоплазм, диссертация, Москва, 2006, с.22-29, с.65-81, 153**

Адрес для переписки:

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, ФБУН
НИИ эпидемиологии и микробиологии имени
Пастера, ОНМИ, Никифоровой Г.Л.

(72) Автор(ы):

Заручейнова Ольга Валентиновна (RU),
Вербов Вячеслав Николаевич (RU),
Рока Вильчес Вашингтон (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки
"Санкт-Петербургский научно-
исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера" (ФБУН
НИИ эпидемиологии и микробиологии
имени Пастера) (RU)

(54) НАБОР ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ MYCOPLASMA HOMINIS И UREAPLASMA UREALYTICUM

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицинской микробиологии. Изобретение представляет собой набор для лабораторной диагностики инфекций, вызываемых урогенитальными микоплазмами *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*, содержащий лиофилизированную транспортную среду для хранения исследуемых проб, лиофилизированную питательную среду для выявления *Mycoplasma hominis* и/или *Ureaplasma urealyticum* и стрипы для идентификации *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*, для полуколичественного определения титра возбудителя и для определения чувствительности

Mycoplasma hominis и *Ureaplasma urealyticum* к антибиотикам, который содержит три вида стрипов, первый из которых предназначен для идентификации *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* и для полуколичественного определения их титра, причем часть лунок первого вида стрипов, которые предназначены для выявления и определения титра *Mycoplasma hominis*, содержат аргинин, бриллиантовый синий и кларитромицин, другая часть лунок этого стрипа, которые предназначены для выявления и определения титра *Ureaplasma urealyticum*, содержат мочевину и линкомицин, второй вид

стрипов предназначен для определения антибиотикочувствительности *Mycoplasma hominis*, содержит специфические реагенты для выявления *Mycoplasma hominis* - аргинин, бриллиантовый синий и кларитромицин, а также восемь антибиотиков - доксицилин, джозамицин, мидекамицин, офлоксацин, ципрофлоксацин, спарфлоксацин, моксифлоксацин, клиндамицин, сорбированных в лунки стрипов в одной концентрации, третий вид стрипов предназначен для определения антибиотикочувствительности *Ureaplasma urealyticum*, содержит специфические реагенты для выявления *Ureaplasma urealyticum* -

мочевина и линкомицин, а также восемь антибиотиков - доксицилин, джозамицин, кларитромицин, эритромицин, рокситромицин, азитромицин, офлоксацин и спарфлоксацин, сорбированных в лунки стрипов в одной концентрации. Использование набора позволяет одновременно выявлять *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*, оценивать их титр и определять чувствительность к различному спектру антибиотиков, причем для *Mycoplasma hominis* и для *Ureaplasma urealyticum* используют разные антибиотики. 2 ил., 2 табл., 3 пр.

R U 2 5 5 3 5 4 8 C 1

R U 2 5 5 3 5 4 8 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2014114705/10, 11.04.2014

(24) Effective date for property rights:
11.04.2014

Priority:

(22) Date of filing: 11.04.2014

(45) Date of publication: 20.06.2015 Bull. № 17

Mail address:

197101, Sankt-Peterburg, ul. Mira, 14, FBUN NII
ehpidemiologii i mikrobiologii imeni Pastera,
ONMI, Nikiforovoj G.L.

(72) Inventor(s):

Zaruchejnova Ol'ga Valentinovna (RU),
Verbov Vjacheslav Nikolaevich (RU),
Roka Vil'ches Vashington (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe bjudzhetnoe uchrezhdenie nauki
"Sankt-Peterburgskij nauchno-issledovatel'skij
institut ehpidemiologii i mikrobiologii imeni
Pastera" (FBUN NII ehpidemiologii i
mikrobiologii imeni Pastera) (RU)

(54) **KIT FOR LABORATORY DIAGNOSIS OF INFECTIONS CAUSED BY MYCOPLASMA HOMINIS AND UREAPLASMA UREALYTICUM**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention is a kit for the laboratory diagnostics of infections caused by urogenital mycoplasmas *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*, containing the lyophilized transport medium for the storage of test samples, freeze-dried nutrient medium for detecting *Mycoplasma hominis* and/or *Ureaplasma urealyticum*, and strips for identification of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* for the semi-quantitative determining the titer of the pathogen and for determining the sensitivity of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* to antibiotics, which comprises three types of strips, the first of which is designed for identification of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* and for semi-quantitative determining of their titre, and some wells of the first type of strips that are designed for identification and determining the titre of *Mycoplasma hominis* contain arginine, brilliant blue and clarithromycin, the other part of the wells of this strip that are designed for identification and determining the titre of *Ureaplasma urealyticum* contain urea and lincomycin, the second type of strips designed for

determining the antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis*, contains specific reagents for detection of *Mycoplasma hominis* - arginine, brilliant blue and clarithromycin, and also eight antibiotics - doxycycline, josamycin, midecamycin, ofloxacin, ciprofloxacin, sparfloracin, moxifloxacin, clindamycin, adsorbed to the wells of the strips in the same concentration, the third type of the strips designed to determine the antibiotic susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* contains specific reagents for detection of *Ureaplasma urealyticum* - urea and lincomycin, and also eight antibiotics - doxycycline, josamycin, clarithromycin, erythromycin, roxithromycin, azithromycin, ofloxacin and sparfloracin, adsorbed to the wells of the strips in the same concentration.

EFFECT: use of the kit enables to detect simultaneously *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*, to evaluate their titre and to determine the sensitivity to different spectrum of antibiotics, and for *Mycoplasma hominis* and for *Ureaplasma urealyticum* different antibiotics are used.

2 dwg, 2 tbl, 3 ex

Изобретение относится к медицинской микробиологии, может быть использовано для культивирования и идентификации урогенитальных микоплазм, в частности *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*, для лабораторной диагностики урогенитальных микоплазмозов путем выявления микоплазм в клиническом материале, для полуколичественного определения титра возбудителя, а также для определения их антибиотикочувствительности.

В последние годы отмечается рост урогенитальных инфекций. Наряду с возбудителями «классических» инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), таких как гонорея, сифилис, трихомониаз, урогенитальный хламидиоз, возрастает удельный вес заболеваний, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, в том числе урогенитальными микоплазмами.

Согласно данным современных исследователей, более чем у 40% больных с воспалительными заболеваниями органов малого таза выявляются урогенитальные микоплазмы, при этом наибольшее клиническое значение имеют три вида микоплазм: *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*.

Mycoplasma hominis и *Ureaplasma urealyticum* могут являться причиной ряда заболеваний урогенитального тракта: негонококковых уретритов, неспецифических вагинитов, простатитов и эпидермитов, развитием цервицитов и кольпитов, в том числе эндометритов и сальпингитов. *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* могут являться этиологическим фактором невынашивания беременности, преждевременных родов, нарушения репродуктивной функции, случаев мертворождения. Частота колонизации урогенитальными микоплазмами нижних отделов мочеполовой системы у детей, по данным различных исследований, варьирует от 2,9 до 22% для *Mycoplasma hominis*, от 8,3 до 30,4% для *Ureaplasma urealyticum*. Таким образом, очевидна необходимость специального обследования всех беременных женщин для выявления случаев урогенитального микоплазмоза и последующей санации.

Для выявления *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* пользуются различными лабораторными диагностическими методами. Наиболее надежным и простым является культуральный метод диагностики урогенитальных инфекций, в том числе для выявления *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* на селективной жидкой питательной среде. Использование этого метода позволяет осуществлять выявление и идентификацию *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*, а также проводить полуколичественную оценку титра. Последнее особенно важно для клинической оценки этиологии воспалительных процессов, так как для микоплазменной инфекции этиологическим значением считается концентрация *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* в исследуемом материале не менее 10000 КОЕ/мл. Культуральным методом можно определять чувствительность выделенных культур к антибиотикам, что выгодно отличает культуральный метод от других методов диагностики урогенитальных микоплазмозов (полимеразной цепной реакции (ПЦР) и реакции иммунофлюоресценции (РИФ)).

Для реализации культурального метода диагностики *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* используются различные наборы реагентов.

Наиболее близким к заявляемому набору реагентов является набор реагентов *Mycoplasma IST 2* для диагностики урогенитального микоплазмоза: культивирования, идентификации, полуколичественной оценки титра, определения чувствительности к антибиотикам возбудителей урогенитального микоплазмоза *Ureaplasma spp.* и *Mycoplasma hominis* (bioMerieux SA, France, Ref. 42 505, [wwwhttp://www.biomerieux.com](http://www.biomerieux.com)), состоящий из транспортной лиофилизированной среды *Mycoplasma R1* для подготовки исследуемых

проб, лиофилизированного мочевино-аргининового бульона *Mycoplasma* R2 и стрипов с сорбированными в них субстратами (феноловый красный - контроль, феноловый красный и линкомицин - тест на *Ureaplasma* spp., эритромицин - тест на *Mycoplasma hominis*) и антибиотиками для определения чувствительности *Ureaplasma* spp. и *Mycoplasma hominis* (доксциклин, джозамицин, офлоксацин, эритромицин, тетрациклин, цiproфлоксацин, азитромицин, кларитромицин - в двух концентрациях, пристинамицин - в одной концентрации). Однако данный набор реагентов не позволяет одновременно определить антибиотикочувствительность к каждому возбудителю (*Mycoplasma hominis*, либо *Ureaplasma urealyticum*) в случае микс-инфекции.

Изобретение направлено на создание набора реагентов для лабораторной диагностики урогенитальных микоплазмозов, вызываемых *Mycoplasma hominis* и/или *Ureaplasma urealyticum*, при этом обеспечен следующий технический результат - одновременное выявление *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*, оценка их титра и определение чувствительности к различному спектру антибиотиков.

Набор содержит лиофилизированную транспортную среду для хранения исследуемых проб, лиофилизированную питательную среду для выявления *Mycoplasma hominis* и/или *Ureaplasma urealyticum* и стрипы для идентификации *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*, для полуколичественного определения титра возбудителя и для определения чувствительности *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* к антибиотикам.

Отличительной особенностью набора является то, что он содержит три вида стрипов. Первый вид стрипов предназначен для идентификации *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*, а также для полуколичественного определения их титра. Часть лунок первого вида стрипов, которые предназначены для выявления и определения титра *Mycoplasma hominis*, содержат аргинин, бриллиантовый синий и кларитромицин, другая часть лунок этого стрипа, которые предназначены для выявления и определения титра *Ureaplasma urealyticum*, содержат мочевины и линкомицин. Второй вид стрипов предназначен для определения антибиотикочувствительности *Mycoplasma hominis*, содержит специфические реагенты для выявления *Mycoplasma hominis* - аргинин, бриллиантовый синий и кларитромицин, а также восемь антибиотиков - доксициклин, джозамицин, mideкамицин, офлоксацин, цiproфлоксацин, спарфлоксацин, моксифлоксацин, клиндамицин, сорбированных в лунки стрипов в одной концентрации. Третий вид стрипов предназначен для определения антибиотикочувствительности *Ureaplasma urealyticum*, содержит специфические реагенты для выявления *Ureaplasma urealyticum* - мочевины и линкомицин, а также восемь антибиотиков - доксициклин, джозамицин, кларитромицин, эритромицин, рокситромицин, азитромицин, офлоксацин и спарфлоксацин, сорбированных в лунки стрипов в одной концентрации.

Сущность изобретения поясняется чертежами, где на фиг.1 представлена схема расположения сред, реагентов и проб в лунках стрипов, на фиг.2 представлен способ анализа инфекций, вызываемых *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*.

Изобретение реализуется следующим образом.

Пример 1. Приготовление лиофилизированной питательной среды для выявления *Mycoplasma hominis* и/или *Ureaplasma urealyticum*.

Селективная универсальная питательная среда для выявления *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* содержит питательную основу, стимуляторы роста, селективные компоненты, лошадиную сыворотку, рН-индикатор и дистиллированную воду. В качестве питательной основы служит пептон ферментативный, плацентарный бульон, РРЛО бульон и натрий хлористый, в качестве стимуляторов роста - дрожжевой экстракт, и в качестве селективных добавок - антибиотики и противогрибковый препарат.

Плацентарный бульон готовят из свежей плаценты, промытой водопроводной водой и тщательно измельченной. Плаценту помещают в кастрюлю, заливают двойным количеством дистиллированной воды и кипятят в течение 30 мин. Полученный бульон осветляют и стерилизуют автоклавированием.

5 Дрожжевой экстракт готовят из свежих хлебопекарных дрожжей (ООО «Дю-Ле», Яст Болагет, Швеция, кат. № 00462, 2014 г.). Дрожжи помещают в кастрюлю в кипящую дистиллированную воду из расчета 250 г/л, кипятят в течение 40 мин. Полученный экстракт осветляют и стерилизуют автоклавированием.

10 Содержание питательной среды имеет следующее соотношение ингредиентов (оптимальное), г/л:

1. Плацентарный бульон	160,00 мл
2. Пептон ферментативный (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия, RM 1892, 2014 г.)	3,20
3. Натрий хлористый (хч, Нева Реактив, ГОСТ 4233-77, 2014 г.)	1,60
4. PPLO бульон б/кф (Pronadisa, Laboratorios CONDA, ЗАО «ДиаКон», кат. №1262, 2014 г.)	10,08
15 5. Феноловый красный (Нева Реактив, PANREAC - 131615, 2014 г.)	0,06
6. Дрожжевой экстракт	100,00 мл
7. Лошадиная сыворотка (ООО «БиолоТ», код: 1.1.5., 2014 г.)	100,00 мл
8. Селективные добавки	0,087
9. Дистиллированная вода	остальное

20 Питательная среда содержит селективные добавки - антибиотики и противогрибковый препарат, при следующем соотношении ингредиентов, г/л:

10. Цефтриаксон	0,064
11. Амоксиклав (амоксициллин натриевая соль/клавулановая кислота калиевая соль)	0,016
12. Ванкомицин гидрохлорид	0,0020
25 13. Флуконазол	0,020

Для приготовления основы питательной среды в 600 мл дистиллированной воды добавляют плацентарный бульон - 160,00 мл, растворяют пептон ферментативный (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия, RM 1892, 2014 г.) - 3,20 г, натрий хлористый (хч, Нева Реактив, ГОСТ 4233-77, 2014 г.) - 1,60 г, PPLO бульон б/кф (Pronadisa, Laboratories CONDA, ЗАО «ДиаКон», кат. №1262, 2014 г.) - 10,08 г, феноловый красный (Нева Реактив, PANREAC-131615, 2014 г.) - 0,06 г. Полученную основу среды стерилизуют автоклавированием.

Для приготовления среды в стерильных условиях смешивают основу питательной среды с дрожжевым экстрактом - 100,00 мл, лошадиной сывороткой (ООО «БиолоТ», код: 1.1.5., 2014 г.) - 100,00 мл. Смесь тщательно перемешивают, затем добавляют цефтриаксон - 0,064 г, амоксиклав (амоксициллин натриевая соль / клавулановая кислота калиевая соль) - 0,016 г, ванкомицина гидрохлорид - 0,0020 г, флуконазол - 0,020 г. Устанавливают рН 6,25-6,45, добавляя по каплям 1N соляную кислоту.

40 Питательную среду разливают в 50 мл флаконы по 15 мл и лиофильно сушат. Перед использованием флакон с лиофилизированной селективной универсальной питательной средой для выявления *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* растворяют 15 мл дистиллированной воды. Условия хранения питательной среды см. таб. 1.

45 В предложенном составе питательной среды представлено оптимальное количественное соотношение компонентов, концентраций антибиотиков и индикаторного красителя.

Данная питательная среда дает возможность проведения идентификации на сорбированных специфическими реагентами и антибиотиками стрипах выделенных культур микоплазм и оценки их количества (титра) в образцах.

Селективная питательная среда для выявления *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* при ее использовании в стрипах, сорбированных специфическими реагентами и антибиотиками, обеспечивает оптимальные условия для роста данного возбудителя при подавлении роста других микоплазм, дрожжеподобных грибов и большинства представителей бактериальной флоры, потенциально содержащихся в исследуемом образце. Наличие в среде рН-индикатора позволяет проводить визуальную оценку результатов исследования по изменению цвета питательной среды в процессе культивирования *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* на стрипах за счет проявления ферментативной активности.

Пример 2. Приготовление стрипов, сорбированных специфическими реагентами и антибиотиками.

В используемых вместе с селективной универсальной питательной средой для выявления *Mycoplasma hominis* и/или *Ureaplasma urealyticum* стрипах сорбированы специфические реагенты и антибиотики (см. фиг.1). В качестве специфических реагентов в лунках стрипов для выявления и определения антибиотикочувствительности *Mycoplasma hominis* служат аргинин, бриллиантовый синий и кларитромицин (для подавления роста других видов микоплазм). В качестве специфических реагентов в лунках стрипов для выявления и определения антибиотикочувствительности *Ureaplasma urealyticum* служат мочевины и линкомицин (для подавления роста других видов микоплазм).

Содержание лунок стрипов, предназначенных для выявления и определения антибиотикочувствительности *Mycoplasma hominis*, имеет следующее соотношение специфических реагентов и антибиотиков, г/л:

25	1. L-аргинина гидрохлорид (имп, НТК «Диаэм», кат. №1119-34-2, 2014 г.)	50,00
	2. Бриллиантовый синий (Нева Реактив, ACROS-22973, 2014 г.)	0,15
	3. Кларитромицин	0,020
	4. Доксициклина гидрохлорид	0,010
	5. Джозамицин	0,010
	6. Мидекамицин	0,040
30	7. Офлоксацин	0,020
	8. Ципрофлоксацина лактат	0,010
	9. Спарфлоксацин	0,0025
	10. Моксифлоксацин	0,0025
	11. Клиндамицина фосфат	0,010

Содержание лунок стрипов, предназначенных для выявления и определения антибиотикочувствительности *Ureaplasma urealyticum*, имеет следующее соотношение специфических реагентов и антибиотиков, г/л:

	1. Мочевина (SERVA Feinbiochemica, кат. 39305.01, 2014 г.)	5,00
	2. Линкомицина гидрохлорид	0,080
40	3. Доксициклина гидрохлорид	0,010
	4. Джозамицин	0,010
	5. Кларитромицин	0,0050
	6. Эритромицин	0,0050
	7. Рокситромицин	0,010
	8. Азитромицин	0,0050
45	9. Офлоксацин	0,020
	10. Спарфлоксацин	0,0050

Для сорбирования стрипов специфическими реагентами и антибиотиками готовят два раствора. Первый раствор содержит следующие реагенты из расчета концентрации на одну лунку: мочевины (SERVA Feinbiochemica, кат. 39305.01, 2014 г.) - 5,00 г/л,

линкомицина гидрохлорид - 0,080 г/л, а второй - L-аргинина гидрохлорид (имп, НТК «Диаэм», кат. № 1119-34-2, 2014 г.) - 50,00 г/л, бриллиантовый синий (Нева Реактив, ACROS-22973, 2014 г.) - 0,15 г/л и кларитромицин - 0,020 г/л. Затем сорбируют по 20 мкл с помощью Labsystems Multidrop в лунки, предназначенные для выявления *Ureaplasma urealyticum*, первый раствор, а в лунки, предназначенные для выявления *Mycoplasma hominis*, второй раствор.

Затем в стрипы, предназначенные для определения антибиотикочувствительности *Ureaplasma urealyticum*, сорбируют по 20 мкл растворы антибиотиков, при этом их концентрации в лунках следующие: доксицилина гидрохлорид - 0,010 г/л, джозамицина - 0,010 г/л, кларитромицина - 0,0050 г/л, эритромицина - 0,0050 г/л, рокситромицина - 0,010 г/л, азитромицина - 0,0050 г/л, офлоксацина - 0,020 г/л, спарфлоксацина 0,0050 г/л. В стрипы, предназначенные для определения антибиотикочувствительности *Mycoplasma hominis*, сорбируют по 20 мкл растворы антибиотиков, при этом их концентрации в лунках следующие: доксицилина гидрохлорид - 0,010 г/л, джозамицина - 0,010 г/л, мидекамицина - 0,040 г/л, офлоксацина - 0,020 г/л, ципрофлоксацина лактат - 0,010 г/л, спарфлоксацина - 0,0025 г/л, моксифлоксацина - 0,0025 г/л, клиндамицина - 0,010 г/л.

Пример 3. Способ диагностики инфекций, вызываемых *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*, с помощью предложенного набора реагентов.

Селективная питательная среда должна обеспечивать рост *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* в лунках стрипов, сорбированных специфическими реагентами и антибиотиками, который сопровождается изменением цвета среды с желтого на красный или красно-малиновый в лунках, предназначенных для выявления *Ureaplasma urealyticum*, за счет проявления уреазной активности, а также изменением цвета среды с зеленого на фиолетовый в лунках, предназначенных для выявления *Mycoplasma hominis*, за счет проявления ферментативной активности, и тормозить рост сопутствующих микроорганизмов (грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов).

Диагностика инфекций, вызываемых *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*, с помощью предложенного набора реагентов включает введение универсальной питательной среды в лунки стрипов с сорбированными в них специфическими реагентами и антибиотиками, исследуемого материала и вещества, создающего анаэробные условия, и анализ изменения цвета питательной среды (см. фиг. 2).

Набор реагентов прост в постановке, не требует специального оборудования, позволяет проводить как выявление возбудителей, так и полуколичественное определение титра и чувствительности к различным антибактериальным препаратам. Использование предложенного набора позволяет повысить скорость, точность и экономичность диагностики микоплазменной инфекции.

Диагностика инфекций, вызываемых *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*, с помощью предложенного набора:

1. В лиофилизированную универсальную питательную среду для выявления *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* добавляют 15 мл дистиллированной воды и перемешивают до полного растворения (в течение 1 мин).

2. Полученную прозрачную среду желтого цвета разливают по 0,85 мл в пробирки для микропроб (для приготовления инокулятов на антибиотикочувствительность *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*) и по 0,8 мл в пробирки для микропроб (для контролей), закрывают и хранят до применения при температуре 2-8°C не более 7 сут или при температуре минус 7°C и ниже не более 2 мес. Перед проведением анализа пробирки со средой выдерживают при комнатной температуре (18-25°C) в течение 1 ч.

3. Анализ состоит из двух этапов:

3.1. Выделение и идентификация урогенитальных микоплазм.

В лунки первого стрипа (без полоски), содержащего различные специфические реагенты, вносят по 90 мкл раствора из пробирки, содержащей 0,8 мл селективной универсальной питательной средой без пробы. При этом среда в лунках, предназначенных для обнаружения, идентификации и полуколичественной оценки титра *Ureaplasma urealyticum*, окрашивается в желтый цвет, а среда в лунках, предназначенных для обнаружения, идентификации и полуколичественной оценки титра *Mycoplasma hominis*, окрашивается в зеленый цвет.

Затем из пробирки, содержащей транспортную среду с исследуемой пробой, вносят 10 мкл в лунку N₁ и 10 мкл в лунку N₅, и делают два последовательных разведения исследуемой пробы с шагом 10. Переносят 10 мкл раствора из лунки N₁ в лунку N₂ (разведение в 10 раз) и перемешивают пипетированием, затем переносят 10 мкл раствора из лунки N₂ в лунку N₃ (разведение в 100 раз) и перемешивают пипетированием. После переносят 10 мкл из лунки N₅ в лунку N₆ (разведение в 10 раз) и перемешивают пипетированием, затем переносят 10 мкл раствора из лунки N₆ в лунку N₇ (разведение в 100 раз) и перемешивают пипетированием.

3.2. Определение антибиотикочувствительности.

Готовят два инокулята добавлением по 85 мкл раствора из пробирки, содержащей транспортную среду с исследуемой пробой, в две пробирки с селективной универсальной питательной средой для выявления *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* (0,85 мл).

Во все лунки стрипов с красной и зеленой полосками (стрипы с антибиотиками) вносят по 100 мкл двух приготовленных инокулятов. Оба стрипа осторожно перемешивают встряхиванием до растворения сорбированных субстратов.

4. Во все лунки стрипов добавляют по 2-3 капли (50-75 мкл) вазелинового масла и стрипы помещают в термостат при температуре 37±1°C.

5. Учет результатов проводят через 24 ч для *Ureaplasma urealyticum* (лунки N₁₋₄) и для *Mycoplasma hominis* (лунки N₅₋₈). Окончательный учет результатов проводят через 48 ч для *Ureaplasma urealyticum* (лунки N₁₋₄) и через 72 ч для *Mycoplasma hominis* (лунки N₅₋₈). Интерпретацию результатов анализа см. таб.2.

5.1. Интерпретация качественного анализа.

В процессе роста микоплазм образуются продукты метаболизма, которые приводят к изменению pH сред. Визуально это проявляется в изменении цвета сред.

Появление красной или красно-малиновой окраски среды (без помутнения) в одной или нескольких лунках N₁, N₂, и N₃ с положительными контролями K(+++), K(++) и K(+) при сохранении исходной желтой окраски среды в контрольной лунке N₄ с K(-) свидетельствует о том, что в исследуемой пробе присутствует *Ureaplasma urealyticum*, т.е. результат является положительным «+».

Отсутствие изменений окраски среды (без помутнения) в лунках N₁, N₂ и N₃ с положительными контролями K(+++), K(++) и K(+) при сохранении исходной желтой окраски среды в контрольной лунке N₄ с K(-) свидетельствует о том, что в исследуемой пробе отсутствует *Ureaplasma urealyticum*, т.е. результат является отрицательным «-».

Появление фиолетовой окраски среды (без помутнения) в одной или нескольких лунках N₅, N₆ и N₇ с положительными контролями K(+++), K(++) и K(+) при сохранении

исходной зеленой окраски среды в контрольной лунке N₈ с K(-) свидетельствует о том, что в исследуемой пробе присутствует *Mycoplasma hominis*, т.е. результат является положительным «+».

Отсутствие изменений окраски среды (без помутнения) в лунках N₅, N₆ и N₇ при сохранении исходной зеленой окраски среды в контрольной лунке N₈ с K(-) свидетельствует о том, что в исследуемой пробе отсутствуют *Mycoplasma hominis*, т.е. результат является отрицательным «-».

5.2. Интерпретация полуколичественного анализа.

Изменение окраски среды только в лунке N₁ (или N₅) с K(+++) при отсутствии изменений в окраске среды в лунках N₂, N₃ и N₄ (или N₆, N₇ и N₈) с K(++), K(+) и K(-) указывает на то, что титры соответствующих возбудителей составляют не более 10² колониеобразующих единиц в мл (КОЕ/мл).

Изменение окраски среды только в лунках N₁, N₂ (или N₅, N₆) с K(+++) и K(++) при отсутствии изменений в окраске среды в лунке N₃ и N₄ (или N₇ и N₈) с K(+) и K(-) указывает на то, что титры соответствующих возбудителей составляют не более 10³ (КОЕ/мл).

Изменение окраски среды в лунках N₁, N₂, N₃ (или N₅, N₆, N₇) с K(+++), K(++) и K(+) при отсутствии изменения в окраске среды в лунке N₄ (или N₈) с K(-) указывает на то, что титры соответствующих возбудителей составляют не менее 10⁴ (КОЕ/мл).

5.3. Определение антибиотикочувствительности.

В лунках других двух стрипов сорбированы антибиотики. После внесения в эти лунки инокулята сорбированные антибиотики растворяются. При изменении цвета среды «+» в лунках стрипа с антибиотиками (красная полоска) штамм *Ureaplasma urealyticum* расценивается как резистентный (R). При отсутствии изменения цвета среды «-» - как чувствительный (S).

При изменении цвета среды «+» в лунках стрипа с антибиотиками (зеленая полоска) штамм *Mycoplasma hominis* расценивается как резистентный (R). При отсутствии изменения цвета среды «-» - как чувствительный (S).

5.3. Примечание.

В исследуемой пробе могут одновременно обнаруживаться *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis*, что свидетельствует о смешенной инфекции или носительстве.

Помутнение среды (при изменении или без изменения окраски) в какой-либо из лунок свидетельствует о росте посторонней микрофлоры. Результаты исследований таких проб учету не подлежат и требуют повторного проведения анализа или дополнительного посева образца на плотную питательную среду *Ureaplasma urealyticum* и (или) *Mycoplasma hominis*.

В качестве транспортной среды используют среду при следующем соотношении ингредиентов, г/л:

Плацентарный бульон	400,0 мл
Пептон ферментативный (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия, RM 1892, 2014 г.)	8,0
Натрий хлористый (хч, Нева Реактив, ГОСТ 4233-77, 2014 г.)	4,0
Дрожжевой экстракт	100,0 мл
Лошадиная сыворотка (ООО «БиолоТ», код: 1.1.5., 2014 г.)	60,0 мл
Цефтриаксон	0,06
Амоксилав (амоксициллина натриевая соль/клавулановая кислота калиевая соль)	0,016
Ванкомицина гидрохлорид	0,002

Для проведения диагностики используется следующий клинический материал:

- соскоб клеток влагалища, цервикального канала, слизистой уретры;
- секрет предстательной железы (0,50-0,10 мл), эякулят (0,50-0,10 мл);
- первая порция утренней мочи (осадок, полученный центрифугированием 10 мл первой порции утренней мочи).

Для достоверной диагностики возбудителей урогенитальных уреоплазмозов необходимо стандартное взятие исследуемого материала и соблюдение условия его хранения:

1. Процедура взятия материала должна быть стандартной. Забор проб осуществлять с помощью ложки Фолькмана или одноразового тампона (щетки);

2. Не использовать при взятии материала местных антисептиков;

3. Необходимо брать материал до начала проведения антибактериальной терапии;

4. Важно получить достаточное количество клеток, поскольку уреоплазма является микроорганизмом, колонизирующим клеточную поверхность;

5. Необходимо тщательное удаление слизи из цервикального канала;

6. Взятие уретральных образцов следует проводить не ранее чем через 2-3 часа после мочеиспускания;

7. Получение секрета предстательной железы и эякулята проводить непосредственно после мочеиспускания;

8. Исследуемый материал помещать в специальную транспортную среду, наилучшим образом обеспечивающую сохранение жизнеспособности микоплазм.

9. Пробирки с пробами в транспортной среде закрыть, промаркировать и доставить в лабораторию. Время и условия транспортировки исследуемых образцов см. таб. 1.

Таб. 1		
Условия хранения сред и образцов		
Материал хранения	Условия хранения	Продолжительность хранения
1. Лиофилизированная универсальная питательная среда для выявления <i>Mycoplasma hominis</i> и <i>Ureaplasma urealyticum</i>	при температуре 2-8 °С при температуре до 25 °С	12 мес. не более 14 сут.
2. Растворенная универсальная питательная среда для выявления <i>Mycoplasma hominis</i> и <i>Ureaplasma urealyticum</i> в пробирках для микропроб	при температуре 2-8 °С при температуре -7 °С и ниже	не более 7 сут. не более 2 мес.
3. Исследуемые образцы в транспортной среде в пробирках для микропроб	при температуре 6-10 °С	8-12 час.

Интерпретация результатов анализа

5

Результаты
 + - есть рост *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*
 -- отсутствие роста *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*

Интерпретация

10

Лунки в стрипах

Выявление
Mycoplasma hominis
 и *Ureaplasma urealyticum*

Обсемененность
 исследуемого
 образца КОЕ
 (колониобразующих
 единиц)/мл
 образца

15

K(+++)

K(++)

K(+)

K(-)

Антибиотики

+

-

-

-

Обнаружено

 10^2

+

+

-

-

Обнаружено

 10^3

+

+

+

-

Обнаружено

 10^4

-

-

-

-

Не выявлено

20

+

R – штамм
устойчив к
антибиотику

25

-

S – штамм
чувствителен к
антибиотику

Формула изобретения

Набор для лабораторной диагностики инфекций, вызываемых урогенитальными микоплазмами *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*, содержащий

лиофилизированную транспортную среду для хранения исследуемых проб, лиофилизированную питательную среду для выявления *Mycoplasma hominis* и/или *Ureaplasma urealyticum* и стрипы для идентификации *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*, для полуколичественного определения титра возбудителя и для определения чувствительности *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* к антибиотикам, отличающийся тем, что он содержит три вида стрипов, первый из которых предназначен для идентификации *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* и для полуколичественного определения их титра, причем часть лунок первого вида стрипов, которые предназначены для выявления и определения титра *Mycoplasma hominis*, содержат аргинин, бриллиантовый синий и кларитромицин, другая часть лунок этого стрипа, которые предназначены для выявления и определения титра *Ureaplasma urealyticum*, содержат мочевины и линкомицин, второй вид стрипов предназначен для определения антибиотикочувствительности *Mycoplasma hominis*, содержит специфические реагенты для выявления *Mycoplasma hominis* - аргинин, бриллиантовый синий и кларитромицин, а также восемь антибиотиков - доксициклин, джозамицин, mideкамицин, офлоксацин, ципрофлоксацин, спарфлоксацин, моксифлоксацин, клиндамицин, сорбированных в лунки стрипов в одной концентрации, третий вид стрипов предназначен для определения антибиотикочувствительности *Ureaplasma urealyticum*, содержит

специфические реагенты для выявления *Ureaplasma urealyticum* - мочевины и линкомицина, а также восемь антибиотиков - доксициклин, джозамицин, кларитромицин, эритромицин, рокситромицин, азитромицин, офлоксацин и спарфлоксацин, сорбированных в лунки стрипов в одной концентрации.

5

10

15

20

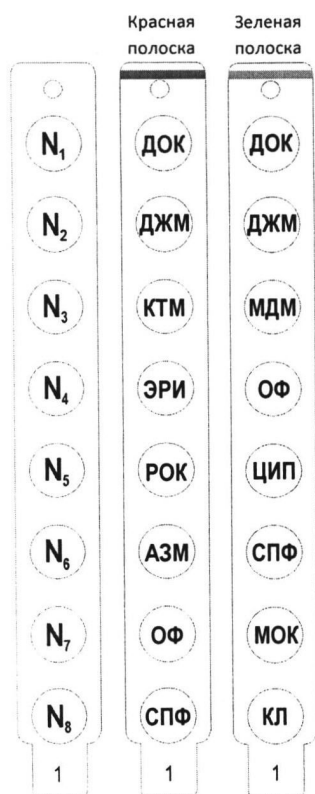
25

30

35

40

45



Тест на *Ureaplasma urealyticum*

(Лунки содержат мочевины и линкомицин)

- Лунка N₁ - исходная проба с возбудителем K(+++);
- Лунка N₂ - 10-кратное разведение исходной пробы K(++);
- Лунка N₃ - 100-кратное разведение исходной пробы K(+);
- Лунка N₄ - контроль питательной среды (среда без пробы) K(-)

Тест на *Mycoplasma hominis*

(Лунки содержат аргинин, бриллиантовый синий и кларитромицин)

- Лунка N₅ - исходная проба с возбудителем K(+++);
- Лунка N₆ - 10-кратное разведение исходной пробы K(++);
- Лунка N₇ - 100-кратное разведение исходной пробы K(+);
- Лунка N₈ - контроль питательной среды (среда без пробы) K(-)

Тест на определение антибиотикочувствительности

Тест на *Ureaplasma urealyticum*

стрип с красной полоской

(Лунки содержат мочевины, линкомицин + следующие антибиотики)

- ДОК – доксицилин
- ДЖМ – джозамицин
- КТМ – кларитромицин
- ЭРИ – эритромицин
- РОК – рокситромицин
- АЗМ – азитромицин
- ОФ – офлоксацин
- СПФ – спарфлоксацин

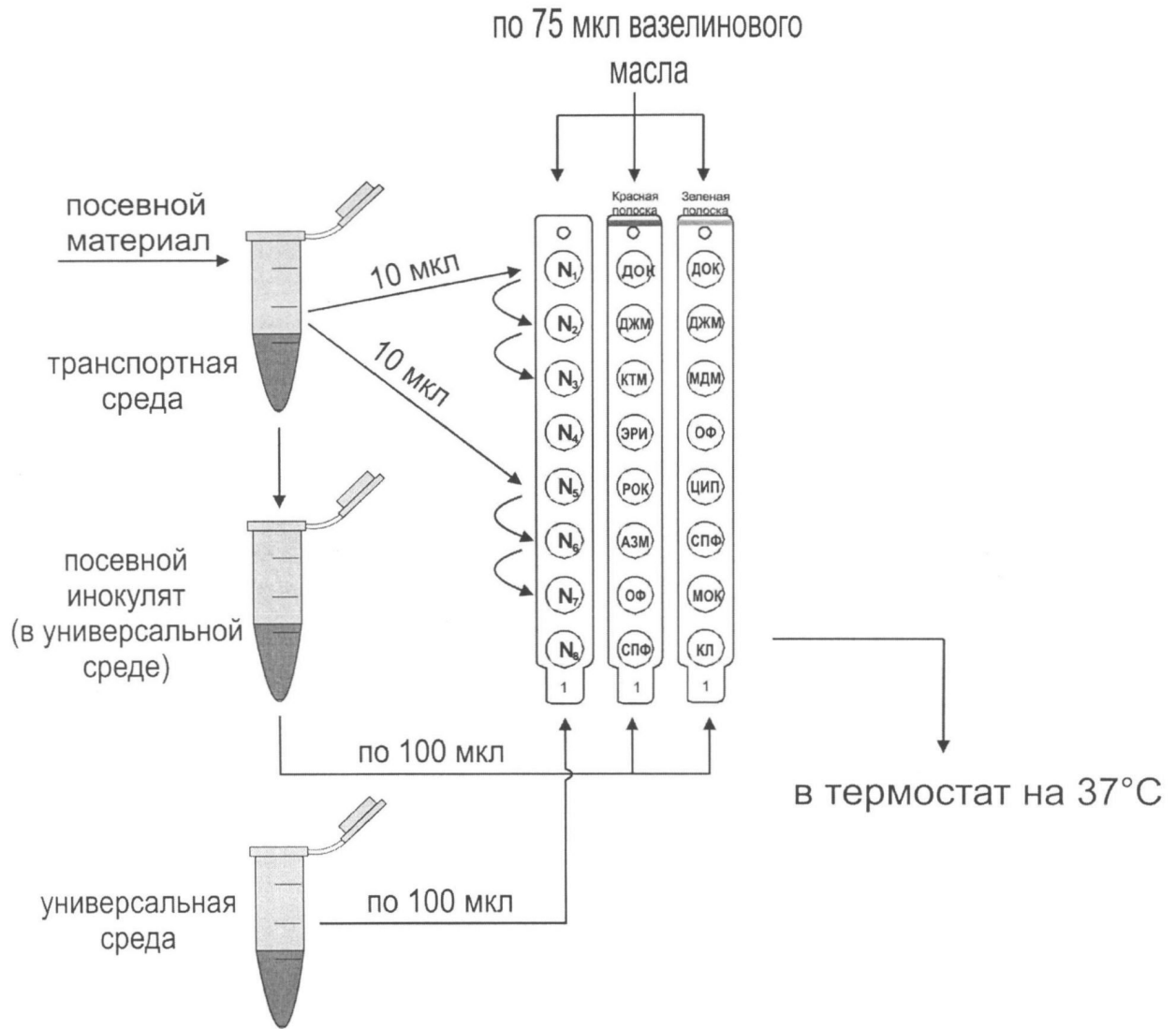
Тест на *Mycoplasma hominis*

стрип с зеленой полоской

(Лунки содержат аргинин, бриллиантовый синий, кларитромицин + следующие антибиотики)

- ДОК – доксицилин
- ДЖМ – джозамицин
- МДМ – мидекамицин
- ОФ – офлоксацин
- ЦИП – ципрофлоксацин
- СПФ – спарфлоксацин
- МОК – моксифлоксацин
- КЛ - клиндамицин

Фиг.1



Фиг.2