



(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12R 1/35 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014114708/10, 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: RU 2261903 C1, 10.10.2005. RU 2265656 C1, 10.12.2005. SU 1397481 A1 , 23.05.1988. SU 1527256 A1 , 07.12.1989. СИДОРОВ М.А., СКОРОДУМОВ Д.И., ФЕДОТОВ В.Б., Определитель зоопатогенных микроорганизмов. Справочник., М, КОЛОС, 1985, стр. 285-286. ПОЛЯК М.С., СУХАРЕВИЧ В.И., СУХАРЕВИЧ М.Э., Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии, Санкт-Петербург, Элби-СПб, 2008, стр. 149-155

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 им. Пастера" (ФБУН НИИ  
эпидемиологии и микробиологии имени  
Пастера) (RU)

## (54) ЛИОФИЛИЗИРОВАННАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВИЗУАЛЬНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ MYCOPLASMA HOMINIS

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицинской микробиологии. Может быть использовано для культивирования и идентификации урогенитальных микоплазм, в частности Mycoplasma hominis. Проводится диагностика урогенитальных микоплазмозов путем выявления Mycoplasma hominis в клиническом материале, а также для полуколичественного определения титра возбудителя. Питательная среда содержит PPLO бульон, феноловый красный,

бриллиантовый синий, L-аргинин гидрохлорид, дрожжевой экстракт, цефтриаксон, амоксиклав (амоксициллин натриевая соль/клавулановая кислота калиевая соль), ванкомицин гидрохлорид, кларитромицин, флуконазол и дистиллированную воду в заданном соотношении компонентов. Изобретение позволяет повысить точность и сократить сроки выявления Mycoplasma hominis. 4 табл., 3 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

*C12N* 1/20 (2006.01)*C12Q* 1/04 (2006.01)*C12R* 1/35 (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2014114708/10, 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 im.  
Pastera" (FBUN NII ehpidemiologii i  
mikrobiologii imeni Pastera) (RU)(54) **LYOPHILISED NUTRIENT MEDIUM FOR VISUAL DETECTION OF MYCOPLASMA HOMINIS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: urogenital mycoplasmosis is diagnosed by detecting *Mycoplasma hominis* in the clinical material, as well as for semi-quantitative determining the titre of the pathogen. The nutrient medium comprises PPLO broth, phenol red, brilliant blue, L-arginine hydrochloride, yeast extract, ceftriaxone, amoxiclav (sodium salt of amoxicillin/

clavulanic acid potassium salt), vancomycin hydrochloride, clarithromycin, fluconazole and distilled water in a predetermined ratio of components.

EFFECT: invention enables to improve the accuracy and to reduce the time of detection of *Mycoplasma hominis*.

4 tbl, 3 ex

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

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* 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* 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*. Таким образом, очевидна необходимость специального обследования всех беременных женщин для выявления случаев урогенитального микоплазмоза и последующей санации.

Для выявления *Mycoplasma hominis* пользуются различными лабораторными диагностическими методами. Наиболее надежным и простым является культуральный метод диагностики урогенитальных инфекций, в том числе для выявления *Mycoplasma hominis* на селективной жидкой питательной среде. Использование этого метода позволяет осуществлять выявление и идентификацию *Mycoplasma hominis*, 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* 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)). Культуральный метод диагностики урогенитальных микоплазмозов является более достоверным в сравнении с РИФ, более низкая чувствительность и специфичность которой определяется малыми линейными размерами этих микроорганизмов, выраженной их гетерогенностью и изменчивостью, часто встречающейся низкой концентрацией микоплазм в первичном материале и, соответственно, необходимости их накопления для выявления, сложностью взятия качественного соскоба для этой реакции.

Из патентной литературы известна "ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ МИКОПЛАЗМ" (см. патент РФ №1397481, 1988). Для приготовления среды в объем дистиллированной воды добавляют, г: питательный бульон 19,21, эритрит 0,01, тиамин-бромид 0,004, аргинин 0,08, цистин 0,4, глюкоза 0,8, ЭКД 4,0, агар 8,96, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,64. Среду тщательно перемешивают и доводят до кипения, затем автоклавируют. После

остывания в среду добавляют 200 мл лошадиной сыворотки и пенициллин. При посевной дозе 10 млн/кл./мл вырастает 120 колоний.

Однако данная питательная среда не лиофилизирована, что сокращает ее срок годности, а также связано со строгим соблюдением принципов холодной цепи, что затрудняет ее длительное хранение, транспортировку и широкое применение. В среде не содержится антимикотиков, подавляющих рост грибов, также в составе среды нет антимикробного препарата, подавляющего рост других микоплазм, а к пенициллину некоторые представители бактериальной флоры приобрели устойчивость, что в полной мере не обеспечивает селективность среды.

Также известна ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКОПЛАЗМ. Для приготовления среды используют перевар сгустков крови человека (триптический перевар) в качестве питательной основы. В качестве стимулятора роста используют сыворотку крови человека 0(1) группы, истощенную механизмами 10-20 мас.%. В состав среды входят, мас.%: 50%-ный дрожжевой экстракт 8-15; глюкоза 0,5-1; хлористый натрий 0,5-1. Все компоненты перемешивают и объем среды доводят до 100 мл переваром сгустков крови. pH среды 7,4-7,8. Рост микоплазм на 3-4-е сутки (См. патент РФ №1527256, С12N 1/20, 1989).

Данная питательная среда имеет аналогичные недостатки, что и в среде, описанной выше (см. патент РФ №1397481, 1988).

Наиболее близкой к заявленной является "ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ MYCOPLASMA HOMINIS И СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ МИКОПЛАЗМОЗОВ". Питательная среда для выявления *Mycoplasma hominis*, в качестве питательной основы она содержит сердечно-мозговую вытяжку 18-22 и триптозу 8-12 г/л, в качестве стимуляторов роста - дрожжевой экстракт 3-4 и среду 199 4,7-5,2 г/л, также содержит аргинин 5-10 г/л, феноловый красный 0,04-0,07 г/л, лошадиную сыворотку 0,25-0,30 г/л и дистиллированную воду. В качестве селективных добавок - антибиотики 0,64-1,27 г/л, при следующем соотношении ингредиентов: ампициллина натриевая соль 0,50-1,00 г/л, ванкомицина гидрохлорид 0,10-0,20 г/л, полимиксин В сульфат 0,01-0,02 г/л, амфотерицин В 0,01-0,02 г/л, эритромицин 0,02-0,03 г/л (См. патент RU №2261903, 2005).

Данная питательная среда не лиофилизирована, что сокращает ее срок годности, а также связано со строгим соблюдением принципов холодной цепи, что затрудняет ее длительное хранение, транспортировку и широкое применение.

Разработана лиофилизированная селективная питательная среда для визуального выявления *Mycoplasma hominis*, которая обладает необходимой чувствительностью и специфичностью. Данная питательная среда дает возможность проведения идентификации выделенных культур микоплазм и оценки их количества (титра) в образцах. Были получены оптимальные соотношения компонентов селективной питательной среды для выявления *Mycoplasma hominis*.

Селективная питательная среда для выявления *Mycoplasma hominis* 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 pH-индикатора позволяет проводить визуальную оценку результатов исследования по изменению цвета питательной среды в процессе культивирования *Mycoplasma hominis* за счет проявления ферментативной активности.

Питательная среда для визуального выявления *Mycoplasma hominis* содержит питательную основу, аргинин, стимуляторы роста, селективные компоненты, лошадиную

сыворотку, рН-индикатор и дистиллированную воду. В качестве питательной основы служит PPLO бульон, в качестве стимуляторов роста - дрожжевой экстракт, в качестве селективных добавок - антибиотики и противогрибковый препарат и в качестве рН-индикатора - феноловый красный и бриллиантовый синий.

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.

Содержание питательной среды имеет следующее соотношение ингредиентов, г/л:

10	1. PPLO бульон б/кф (Pronadisa, Laboratorios CONDA, ЗАО «ДиаКон», кат. №1262, 2014 г.)	32,00-35,00
	2. Феноловый красный (Нева Реактив, PANREAC-131615, 2014 г.)	0,10-0,14
	3. Бриллиантовый синий (Нева Реактив, ACROS-22973, 2014 г.)	0,04-0,08
	4. L-аргинина гидрохлорид (имп, НТК «Диаэм», кат. №1119-34-2, 2014 г.)	18,0-22,0
	5. Дрожжевой экстракт	150,00-250,00 мл
15	6. Лошадина сыворотка (ООО «БиолоТ», код: 1.1.5., 2014 г.)	150,00-250,00 мл
	7. Селективные добавки	0,199-0,232
	8. Дистиллированная вода	остальное

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

20	9. Цефтриаксон	0,10-0,14
	10. Амоксилав (амоксициллин натриевая соль/клавулановая кислота калиевая соль)	0,025-0,035
	11. Ванкомицин гидрохлорид	0,003-0,005
	12. Кларитромицин	0,006-0,010
	13. Флуконазол	0,038-0,042

25 Питательную среду разливают в 100 мл флаконы по 25 мл и лиофильно сушат. Перед использованием флакон с лиофильной питательной средой для выявления *Mycoplasma hominis* растворяют в 50 мл дистиллированной воды. Условия хранения питательной среды см. табл. 1.

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

Достижимый технический результат - упрощение состава рецептуры, повышение скорости и точности диагностики микоплазменной инфекции за счет повышения чувствительности и селективности среды. Кроме того, среда обеспечивает высокие ростовые свойства, позволяющие проводить учет роста *M. hominis* через 24 ч, четкий визуальный учет результатов. Последнее достигается за счет использования смеси двух красителей, один из которых рН-зависимый. При рН 6,7-6,9 (начало роста *M. hominis*) цвет среды - фиолетовый, что визуально более отличимо, чем желтый или малиновый цвета среды в прототипе. Высокая селективность заявляемой среды обеспечивается за 35 счет использования оптимального набора антибактериальных и противогрибковых препаратов, например флуконазола, который даже в высокой концентрации не подавляет рост *M. hominis*, в отличие от амфотерецина В, используемого в прототипе. Использование более новых антибиотиков цефтриаксона, амоксиклава вместо ампициллина и полимиксина В обеспечивает высокую селективность в отношении 45 большинства представителей грамположительной и грамотрицательной бактериальной флоры, потенциально содержащейся в исследуемом образце.

В таблице 2 представлен сравнительный анализ компонентов заявляемой среды с ближайшим аналогом. В таблице на одной строке указаны компоненты, выполняющие

одинаковую функцию. Проведенный анализ ростовых и селективных свойств заявляемой среды и ближайшего аналога представлен в таблице 3.

Для приготовления основы среды в 400 мл дистиллированной воды растворяют PPLO бульон б/кф (Pronadisa, Laboratorios CONDA, ЗАО «ДиаКон», кат. №1262, 2014 г.) - 32,00-35,00 г, L-аргинина гидрохлорид (имп, НТК «Диаэм», кат. №1119-34-2, 2014 г.) - 18,0-22,0 г, феноловый красный (Нева Реактив, PANREAC-131615, 2014 г.) - 0,10-0,14 г и бриллиантовый синий (Нева Реактив, ACROS-22973, 2014 г.) - 0,04-0,08 г. Доводят раствор дистиллированной водой до 700 мл, 600 мл или 500 мл, в соответствии с каждым ниже приведенным примером. Полученную основу среды стерилизуют автоклавированием.

Для приготовления среды в стерильных условиях смешивают 700 мл, 600 мл или 500 мл основы питательной среды с дрожжевым экстрактом - 150,00-250,00 мл, лошадиной сывороткой (ООО «БиолоТ», код: 1.1.5., 2014 г.) - 150,00-250,00 мл. Смесь тщательно перемешивают, затем добавляют цефтриаксон - 0,10-0,14 г, амоксиклав (амоксициллин натриевая соль / клавулановая кислота калиевая соль) - 0,025-0,035 г, ванкомицина гидрохлорид - 0,003-0,005 г, флуконазол - 0,038-0,042 г, кларитромицин - 0,006-0,010 г. Устанавливают pH 6,7-6,9, добавляя по каплям 1N соляную кислоту. Конечный объем питательной среды составляет 1000 мл.

#### Пример 1.

20 Состав среды:

1. PPLO бульон б/кф (Pronadisa, Laboratorios CONDA, ЗАО «ДиаКон», кат. №1262, 2014 г.)	32,00
2. Феноловый красный (Нева Реактив, PANREAC-131615, 2014 г.)	0,10
3. Бриллиантовый синий (Нева Реактив, ACROS-22973, 2014 г.)	0,04
4. L-аргинина гидрохлорид (имп, НТК «Диаэм», кат. №1119-34-2, 2014 г.)	18,0
5. Дрожжевой экстракт	150,00 мл
6. Лошадиная сыворотка (ООО «БиолоТ», код: 1.1.5., 2014 г.)	150,00 мл
7. Цефтриаксон	0,10
8. Амоксиклав (амоксициллин натриевая соль/клавулановая кислота калиевая соль)	0,025
9. Ванкомицин гидрохлорид	0,003
10. Кларитромицин	0,006
11. Флуконазол	0,038
12. Дистиллированная вода	остальное

Для приготовления основы среды в 400 мл дистиллированной воды растворяют PPLO бульон б/кф (Pronadisa, Laboratorios CONDA, ЗАО «ДиаКон», кат. №1262, 2014 г.) - 32,00 г, L-аргинина гидрохлорид (имп, НТК «Диаэм», кат. №1119-34-2, 2014 г.) - 18,0 г, феноловый красный (Нева Реактив, PANREAC-131615, 2014 г.) - 0,10 г и бриллиантовый синий (Нева Реактив, ACROS-22973, 2014 г.) - 0,04 г. Доводят раствор дистиллированной водой до 700 мл. Полученную основу среды стерилизуют автоклавированием.

Для приготовления среды в стерильных условиях смешивают 700 мл основы питательной среды с дрожжевым экстрактом - 150,00 мл, лошадиной сывороткой (ООО «БиолоТ», код: 1.1.5., 2014 г.) - 150,00 мл. Смесь тщательно перемешивают, затем добавляют цефтриаксон - 0,10 г, амоксиклав (амоксициллин натриевая соль/клавулановая кислота калиевая соль) - 0,025 г, ванкомицина гидрохлорид - 0,003 г, флуконазол - 0,038 г, кларитромицин - 0,006 г. Устанавливают pH 6,7-6,9, добавляя по каплям 1N соляную кислоту. Конечный объем питательной среды составляет 1000 мл.

45 Пример 2 (оптимальный).

Состав среды:

1. PPLO бульон б/кф (Pronadisa, Laboratorios CONDA, ЗАО «ДиаКон», кат. №1262, 2014 г.)	34,00
2. Феноловый красный (Нева Реактив, PANREAC-131615, 2014 г.)	0,12

	3. Бриллиантовый синий (Нева Реактив, ACROS-22973, 2014 г.)	0,06
	4. L-аргинина гидрохлорид (имп, НТК «Диаэм», кат. №1119-34-2, 2014 г.)	20,0
	5. Дрожжевой экстракт	200,00 мл
	6. Лошадиная сыворотка (ООО «БиолоТ», код: 1.1.5., 2014 г.)	200,00 мл
	7. Цефтриаксон	0,12
5	8. Амоксиклав (амоксициллин натриевая соль/клавулановая кислота калиевая соль)	0,032
	9. Ванкомицин гидрохлорид	0,004
	10. Кларитромицин	0,008
	11. Флуконазол	0,040
	12. Дистиллированная вода	остальное

10 Для приготовления основы среды в 400 мл дистиллированной воды растворяют PPLO бульон б/кф (Pronadisa, Laboratorios CONDA, ЗАО «ДиаКон», кат. №1262, 2014 г.) - 34,00 г, L-аргинина гидрохлорид (имп, НТК «Диаэм», кат. №1119-34-2, 2014 г.) - 20,0 г, феноловый красный (Нева Реактив, PANREAC-131615, 2014 г.) - 0,12 г и бриллиантовый синий (Нева Реактив, ACROS-22973, 2014 г.) - 0,06 г. Доводят раствор дистиллированной водой до 600 мл. Полученную основу среды стерилизуют автоклавированием.

15 Для приготовления среды в стерильных условиях смешивают 60 мл основы питательной среды с дрожжевым экстрактом - 200,00 мл, лошадиной сывороткой (ООО «БиолоТ», код: 1.1.5., 2014 г.) - 200,00 мл. Смесь тщательно перемешивают, затем добавляют цефтриаксон - 0,12 г, амоксиклав (амоксициллин натриевая соль/клавулановая кислота калиевая соль) - 0,032 г, ванкомицина гидрохлорид - 0,004 г, флуконазол - 0,040 г, кларитромицин - 0,008 г. Устанавливают pH 6,7-6,9, добавляя по каплям 1N соляную кислоту.

Конечный объем питательной среды составляет 1000 мл.

Пример 3.

25 Состав среды:

	1. PPLO бульон б/кф (Pronadisa, Laboratorios CONDA, ЗАО «ДиаКон», кат. №1262, 2014 г.)	35,00
	2. Феноловый красный (Нева Реактив, PANREAC-131615, 2014 г.)	0,14
	3. Бриллиантовый синий (Нева Реактив, ACROS-22973, 2014 г.)	0,08
	4. L-аргинина гидрохлорид (имп, НТК «Диаэм», кат. №1119-34-2, 2014 г.)	22,0
30	5. Дрожжевой экстракт	250,00 мл
	6. Лошадиная сыворотка (ООО «БиолоТ», код: 1.1.5., 2014 г.)	250,00 мл
	7. Цефтриаксон	0,14
	8. Амоксиклав (амоксициллин натриевая соль/клавулановая кислота калиевая соль)	0,035
	9. Ванкомицин гидрохлорид	0,005
	10. Кларитромицин	0,010
35	11. Флуконазол	0,042
	12. Дистиллированная вода	остальное

40 Для приготовления основы среды в 400 мл дистиллированной воды растворяют PPLO бульон б/кф (Pronadisa, Laboratorios CONDA, ЗАО «ДиаКон», кат. №1262, 2014 г.) - 35,00 г, L-аргинина гидрохлорид (имп, НТК «Диаэм», кат. №1119-34-2, 2014 г.) - 22,0 г, феноловый красный (Нева Реактив, PANREAC-131615, 2014 г.) - 0,14 г и бриллиантовый синий (Нева Реактив, ACROS-22973, 2014 г.) - 0,08 г. Доводят раствор дистиллированной водой до 500 мл. Полученную основу среды стерилизуют автоклавированием.

45 Для приготовления среды в стерильных условиях смешивают 500 мл основы питательной среды с дрожжевым экстрактом - 250,00 мл, лошадиной сывороткой (ООО «БиолоТ», код: 1.1.5., 2014 г.) - 250,00 мл. Смесь тщательно перемешивают, затем добавляют цефтриаксон - 0,14 г, амоксиклав (амоксициллин натриевая соль/клавулановая кислота калиевая соль) - 0,035 г, ванкомицина гидрохлорид - 0,005 г, флуконазол - 0,042 г, кларитромицин - 0,010 г. Устанавливают pH 6,7-6,9, добавляя по каплям 1N соляную кислоту. Конечный объем питательной среды составляет 1000 мл.

Селективная питательная среда должна обеспечивать рост *Mycoplasma hominis*, который сопровождается изменением цвета среды с зеленого на фиолетовый за счет проявления ферментативной активности, и тормозить рост сопутствующих микроорганизмов (грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов и других микоплазм).

Диагностика инфекций, вызываемых *Mycoplasma hominis*, с помощью питательной среды для визуального выявления *Mycoplasma hominis* включает внесение исследуемого материала в пробирки для микропроб, содержащих питательную среду, проведение двух последовательных разведений исследуемой пробы в среде с шагом 10 и оценку изменения цвета питательной среды в пробирках. В качестве питательной среды используют:

питательную среду, содержащую питательную основу, аргинин, стимуляторы роста, селективные компоненты, лошадиную сыворотку, рН-индикатор и дистиллированную воду. В качестве питательной основы среда содержит PPLO бульон, в качестве стимуляторов роста - дрожжевой экстракт, в качестве селективных добавок - антибиотики и противогрибковый препарат, и в качестве рН-индикатора - феноловый красный и бриллиантовый синий.

Способ диагностики прост в постановке, не требует специального оборудования, позволяет проводить как выявление возбудителя, так и полуколичественное определение его титра.

Диагностика инфекций, вызываемых *Mycoplasma hominis* с помощью питательной среды для выявления *Mycoplasma hominis*, включает:

1. В лиофилизированную питательную среду для выявления *Mycoplasma hominis* добавляют двойной объем дистиллированной воды и перемешивают до полного растворения (в течение 1 мин).

2. Полученную прозрачную среду зеленого цвета разливают по 0,9 мл в пробирки для микропроб, 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. В зависимости от целей исследования дальнейшее определение может быть проведено в варианте качественного или полуколичественного анализа.

3.1. Проведение качественного анализа.

Вносят исследуемую пробу в объеме 100 мкл раствора из пробирки с пробой в транспортной среде в пробирку, обозначенную К(+++) и содержащую 0,9 мл жидкой питательной среды для выявления *Mycoplasma hominis*.

3.2. Проведение полуколичественного анализа.

Делают два последовательных разведения исследуемой пробы с шагом 10. Для этого исходную пробирку с пробой, обозначенную К(+++), встряхивают и переносят из нее 100 мкл раствора в другую пробирку, обозначенную К(++) и содержащую 0,9 мл питательной среды для выявления *Mycoplasma hominis*, что соответствует разведению в 10 раз. Затем переносят 100 мкл раствора из пробирки К(++) в пробирку, обозначенную К(+) и содержащую 0,9 мл питательной среды для выявления *Mycoplasma hominis*, что соответствует разведению исследуемой пробы в 100 раз.

4. Пробирки с исследуемыми пробами и одну пробирку без пробы (контроль питательной среды К(-)) помещают в термостат при температуре 37±1°C.

5. Учет результатов проводят через 24 ч. Окончательный учет результатов проводят через 72 ч. Рост *Mycoplasma hominis* сопровождается изменением цвета питательной среды с зеленого на фиолетовый, без помутнения, за счет проявления ферментативной



активности, гидролиза аргинина и сдвига pH. В случае низкой обсемененности материала изменение цвета среды происходит на третьи сутки.

Интерпретацию результатов анализа см. табл. 2.

### 5.1. Интерпретация качественного анализа.

5 Положительным результатом «+» считается появление фиолетовой окраски среды в пробирке с исследуемой пробой K(+++) при сохранении зеленой (исходной) окраски в контрольной пробирке K(-). Отсутствие изменения окраски среды в исследуемой пробе K(+++) по сравнению с окраской среды в контрольной пробирке K(-) оценивается как отрицательный результат «-».

### 10 5.2. Интерпретация полуколичественного анализа.

Появление фиолетовой окраски среды только в пробирке K(+++) при отсутствии изменений в окраске среды в пробирках K(++), K(+) и K(-) указывает на то, что титр *Mycoplasma hominis* составляет не более  $10^2$  колониеобразующих единиц в мл (КОЕ/мл). Появление фиолетовой окраски среды в двух пробирках K(+++) и K(++) при отсутствии изменений в окраске среды в пробирках K(+) и K(-) указывает на то, что титр *Mycoplasma hominis* составляет не более  $10^3$  КОЕ/мл. Появление фиолетовой окраски среды в трех пробирках K(+++), K(++) и K(+) при отсутствии изменения в окраске среды в пробирке K(-) свидетельствует о том, что титр *Mycoplasma hominis* составляет не менее  $10^4$  КОЕ/мл.

Отсутствие изменения окраски среды в трех пробирках с пробой K(+++), K(++) и K(+) по сравнению с окраской среды в контрольной пробирке K(-) считается отрицательным результатом «-».

### 5.3. Примечание.

25 Помутнение среды во время культивирования (при изменении или без изменения окраски в пробирках с исследуемыми пробами) свидетельствует о росте посторонней микрофлоры. Результаты исследования таких проб учету не подлежат и требуют повторного проведения анализа или дополнительного посева на плотную питательную среду для морфологической идентификации колоний *Mycoplasma hominis*.

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

Плацентарный бульон	350,0-450,0 мл
Пептон ферментативный (HiMedia Laboratorios Pvt. Limited, Индия, RM 1892, 2014 г.)	7,0-9,0
Натрий хлористый (хч, Нева Реактив, ГОСТ 4233-77, 2014 г.)	3,5-4,5
35 Дрожжевой экстракт	80,0-120,0 мл
Лошадиная сыворотка (ООО «БиолоТ», код: 1.1.5., 2014 г.)	50,0-70,0 мл
Цефтриаксон	0,05-0,07
Амоксиклав (амоксициллина натриевая соль/клавулановая кислота калиевая соль)	0,01-0,02
Ванкомицина гидрохлорид	0,0015-0,0025
Амфотерицин В	0,004-0,006
40 Дистиллированная вода	остальное

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 микоплазмозов 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 микоплазма 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;
10. 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. табл.1.
- 15

Табл. 1		
Условия хранения сред и образцов		
Материал хранения	Условия хранения	Продолжительность хранения
1. Лиофилизированная питательная среда для выявления <i>Mycoplasma hominis</i>	при температуре 2-8 °С при температуре до 25 °С	12 мес. не более 14 сут.
2. Растворенная питательная среда для выявления <i>Mycoplasma hominis</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.

Табл. 2					
Интерпретация результатов исследования					
Результаты				Интерпретация	
Пробирки					
+	-	-	-	Выявление <i>Mycoplasma hominis</i>	Обсемененность исследуемого образца КОЕ (колониобразующих единиц)/мл образца
K(+++)	K(++)	K(+)	K(-)		
+			-	Обнаружено	*
-			-	Не выявлено	*
+	-	-	-	Обнаружено	$10^2$
+	+	-	-	Обнаружено	$10^3$
+	+	+	-	Обнаружено	$10^4$
-	-	-	-	Не выявлено	

\* - качественный анализ

Чувствительность и специфичность данной питательной среды имеют стандартные значения для культурального метода диагностики.

#### Формула изобретения

5 Питательная среда для визуального выявления *Mycoplasma hominis*, содержащая питательную основу, аргинин, стимуляторы роста, селективные компоненты, лошадиную сыворотку, рН-индикатор и дистиллированную воду, отличающаяся тем, что в качестве питательной основы служит PPLO бульон, в качестве стимуляторов роста - дрожжевой  
10 в качестве селективных добавок - антибиотики и противогрибковый препарат, в качестве рН-индикатора - феноловый красный и бриллиантовый синий, при следующем соотношении ингредиентов, г/л:

	PPLO бульон	32,00-35,00
	Феноловый красный	0,10-0,14
	Бриллиантовый синий	0,04-0,08
15	L-аргинин гидрохлорид	18,0-22,0
	Дрожжевой экстракт	150,00-250,00 мл
	Лошадиная сыворотка	150,00-250,00 мл
	Цефтриаксон	0,10-0,14
	Амоксиклав (амоксициллин натриевая соль/клавулановая кислота калиевая соль)	0,025-0,035
20	Ванкомицин гидрохлорид	0,003-0,005
	Кларитромицин	0,006-0,010
	Флуконазол	0,038-0,042
	Дистиллированная вода	остальное

25

30

35

40

45