

*На правах рукописи*

**Заручейнова Ольга Валентиновна**

**РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ НАБОРОВ  
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ  
УРОГЕНИТАЛЬНЫХ МИКОПЛАЗМ**

03.02.03 – микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2015

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

**Научный руководитель:**

Доктор медицинских наук, член-корр. РАН,

Профессор

Жебрун Анатолий Борисович

**Официальные оппоненты:**

**Савичева Алевтина Михайловна** - доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»

**Припутневич Татьяна Валерьевна** – доктор медицинских наук, заведующая отделом микробиологии и клинической фармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 года в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук

Борисова Ольга Юрьевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

С урогенитальными микоплазмами *Ureaplasma spp.* и *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*) связывают такие распространенные инфекции, как негонококковые уретриты (Прилепская В.Н. и соавт., 2007; Martin D.H., 2008; Oriel J.D., 1983; Povlsen K. et al., 2002), простатиты (Липова Е.В. и соавт., 2009), воспаления органов малого таза, неспецифические вагиниты (Baka S. et al., 2009; Keane F.E. et al., 2000), эндометриты и сальпингиты (Elias M. et al., 2005). Они могут вызывать преждевременные роды, нарушения репродуктивной функции, случаи мертворождения, рождения детей с малым весом, сепсисом и болезнями респираторного тракта (Маликов В.Е. и соавт., 2001; Раковская И.В. и соавт., 2004; Кубанова А.А. и соавт., 2009; Abele-Horn M. et al., 1997; Cassell G.H. et al., 1993; Gupta A. et al., 2009). Показатели инфицированности населения микоплазмами, по данным разных авторов, варьируются от 11 до 80% для *Ureaplasma spp.* и от 10 до 50% для *M. hominis* (Ковалев Ю.Н. и соавт., 1998; Козлова В.И. и соавт., 2003; Taylor-Robinson D. et al., 1979; Arya O.P. et al., 2000; Maeda S. et al., 2004; Tait J. et al., 1985; Waites K.B. et al., 2009; Taylor-Robinson D., 2007). В тоже время, установлено непатогенное бессимптомное носительство микоплазм, поскольку они обнаруживаются в урогенитальном тракте людей, считающих себя здоровыми.

Для постановки диагноза и назначения лечения необходима информация о количественном содержании *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* в исследуемых пробах (Кисина В.И. и соавт., 2007; Колупаев В.Е. и соавт., 2009; Кунгуров Н.В. и соавт., 2010). Считается, что клинически значимый титр для урогенитальных микоплазм, при котором требуется антибиотикотерапия, составляет  $10^4$  КОЕ/мл. После обнаружения возбудителя в клиническом материале встает проблема определения его спектра антибиотикочувствительности. Направленная терапия с учетом чувствительности к антибактериальным препаратам эффективнее по сравнению с произвольным назначением лекарственных средств из числа рекомендованных препаратов. Предварительное определение антибиотикочувствительности при назначении лечения позволяет снизить удельный вес положительных результатов при повторном обследовании после курса антибиотикотерапии с 37,3% до 7,7% (Колупаев В.Е. и соавт., 2009).

Лабораторные методы играют решающую роль в диагностике микоплазменных инфекций вследствие широкого распространения бессимптомного носительства,

отсутствия четких клинических проявлений и частого сочетания микоплазм с другими возбудителями. Несмотря на широкое использование в настоящее время молекулярно-биологических методов, культуральный метод в диагностике микоплазменных инфекций сохранил позиции, как наиболее достоверный и информативный. Он позволяет не только с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять возбудитель, но и оценивать его количественное содержание в исследуемом материале, а также определять чувствительность выделенных штаммов к антибактериальным препаратам (Дмитриев Г.А., 2007; Прозоровский С.В. и соавт., 1995; Савичева А.М. и соавт., 2008). Таким образом, разработка комплекса диагностических наборов для выявления, идентификации, количественной оценки титра урогенитальных микоплазм, а также для определения их антибиотикочувствительности является актуальной задачей.

### **Степень разработанности темы исследования**

В настоящее время перспективным подходом в лабораторной диагностике является использование наборов в виде микротест-систем, избавляющих микробиологов от трудоемких работ и позволяющих получать стандартные, воспроизводимые результаты. В Российской Федерации зарегистрированы зарубежные наборы для культуральной диагностики *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* и определения их антибиотикочувствительности, такие как «MYCOFAST» компании «EliTech»; «MYCOPLASMA DUO», «Mycoplasma SIR» компании «Bio-Rad»; «MYCOPLASMA-IST» компании «BioMerieux», обладающие высокой диагностической эффективностью. Отечественных наборов, позволяющих комплексно решать проблемы культуральной диагностики микоплазменных инфекций, на данный момент нет. В свете вышесказанного, несомненно, важнейшей задачей является разработка новых диагностических наборов в виде микротест-систем для выявления *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* с возможностью количественной оценки их титра, а также определения чувствительности к расширенному спектру антибиотиков различных групп. Разработанные диагностические наборы должны стать эффективным, экономичным и информативным инструментом в практике микробиологической диагностики микоплазменных инфекций и обеспечить получение стандартных, воспроизводимых результатов.

**Цель исследования:** Создание комплекса диагностических наборов для выявления, идентификации, количественной оценки титра урогенитальных микоплазм *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.* и определения их чувствительности к антибактериальным препаратам различных групп.

### **Задачи исследования:**

1. Разработать селективные питательные среды для выявления и идентификации *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.*
2. Изучить чувствительность *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.* к антибактериальным препаратам различных групп.
3. Сконструировать наборы реагентов для определения чувствительности *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.* к антибактериальным препаратам.
4. Изучить диагностическую эффективность разработанных питательных сред и наборов.

### **Научная новизна исследования**

Разработаны оригинальные рецептуры и методики приготовления селективных питательных сред для выявления *M. hominis* и *Ureaplasma spp.*, а также рецептуры транспортной и защитной сред. Эффективность разработок была доказана в серии экспериментов, достоверно подтверждающих отсутствие роста других микроорганизмов в селективной питательной среде, сохранение жизнеспособности микоплазм в течение 24 ч в транспортной среде и сохранение жизнеспособности *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* при лиофилизации в защитной среде.

Впервые предложен и экспериментально обоснован состав универсальной питательной среды, которая входит в состав набора реагентов, предназначенного для одновременного количественного выявления *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* и определения их антибиотикочувствительности.

Впервые, на основании полученных новых данных по чувствительности *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* к различным антибактериальным препаратам (группы тетрациклинов, макролидов, фторхинолонов, линкозамидов и аминогликозидов), разработано три набора реагентов, предназначенных для определения антибиотикочувствительности урогенитальных микоплазм.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Теоретическая значимость исследования состоит в том, что полученные данные по изучению антибиотикочувствительности урогенитальных микоплазм *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* могут быть использованы для создания отечественных критериев чувствительности микоплазм к различным антибактериальным препаратам.

Комплекс разработанных диагностических наборов, предназначенных для одно-

временного количественного выявления этих возбудителей в клиническом материале и для определения их антибиотикочувствительности, позволяет улучшить лабораторную диагностику урогенитальных микоплазменных инфекций и проводить своевременную адекватную терапию.

Все разработанные питательные среды и наборы реагентов внедрены в производство, широко используются в кожно-венерологических диспансерах, диагностических центрах и бактериологических лабораториях лечебно-профилактических учреждений здравоохранения, центрах гигиены и эпидемиологии по всей территории Российской Федерации. Разработанные наборы реагентов не уступают в своей эффективности зарубежным аналогам.

Практическая значимость исследования подтверждена составленной нормативной документацией (регламент производства, технические условия, инструкция по применению), а также следующими регистрационными удостоверениями в едином реестре изделий медицинского назначения Российской Федерации:

1. Набор реагентов для визуального выявления *M. hominis* (ФСР № 2009/05983);
2. Набор реагентов для визуального выявления *U. urealyticum* (ФСР № 2009/05984);
3. Набор реагентов для определения антибиотикочувствительности *M. hominis* (ФСР № 2009/05985);
4. Набор реагентов для определения антибиотикочувствительности *U. urealyticum* (ФСР № 2009/05986);
5. Набор реагентов для одновременного выявления *U. urealyticum* и *M. hominis* (ФСР № 2009/05987).

Получено положительное решение о выдаче трех патентов Российской Федерации на изобретения: «Лиофилизированная питательная среда для визуального выявления *Mycoplasma hominis*» (заявка №2014114708 от 11.04.14); «Лиофилизированная питательная среда для визуального выявления *Ureaplasma urealyticum*» (заявка №2014114707 от 11.04.14); «Набор реагентов для лабораторной диагностики инфекций, вызываемых *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*» (заявка 2014114705 от 11.04.14).

#### **Методология и методы исследования**

Предмет исследования представлял собой разработку средств для индикации, идентификации и контроля антибиотикочувствительности (АЧ) урогенитальных

микоплазм, а также оценки их аналитической надежности. После анализа научной литературы, посвященной проблеме микоплазменных инфекций, ассоциированных с *M. hominis* и *Ureaplasma spp.*, было проведено планирование исследований. Они были направлены на поиск и экспериментальное обоснование оптимального состава питательных сред и наборов. Опытные партии питательных сред и наборов оценивались в модельных экспериментах с использованием контрольных штаммов в стандартных условиях. Экспериментально-производственные серии селективных питательных сред и наборов реагентов были клинически апробированы в сравнительных испытаниях с зарубежными аналогами и молекулярно-генетическими методами лабораторной диагностики микоплазменных инфекций.

## **Материалы и методы исследования**

### Объекты исследования

При разработке селективных питательных сред для выявления урогенитальных микоплазм, сравнительном изучении их чувствительности к антибактериальным препаратам (АБП) использовали клинические изоляты *Ureaplasma spp.* и *M. hominis*, полученные из Городского Консультативно-Диагностического Центра при больнице им. Боткина, г. С.-Петербург. Все изоляты были свежевыделены из клинического материала пациентов и подтверждены посевом на плотные питательные среды (Bacto PPLO-agar с добавлением Bacto Mycoplasma/Ureaplasma Supplement) (Difco, США) для морфологической идентификации колоний *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* Всего было исследовано 134 изолята *Ureaplasma spp.* и 142 изолята *M. hominis*. В вышеперечисленных исследованиях также использовали эталонные штаммы *M. hominis* (H-34) и *U. urealyticum* (серотип 8) из музея культур микоплазм ФГБУ "ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России.

В опытах по повышению селективности питательных сред и по оценке селективных свойств разработанных сред использовали референтные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 24433 (из американской типовой коллекции культур).

Для исследований по выявляемости микоплазменной инфекции методом полимеразной цепной реакции в «реальном времени» (ПЦР-РВ) и культуральным методом (КМ) на разработанных нами питательных средах было проведено обследование клинического материала 277 человек (170 мужчин, 107 женщин),

обратившихся для амбулаторного обследования в Медицинский центр ФБУН НИИЭМ им. Пастера, г. С.-Петербург. Материалом для исследования служили соскобы эпителиальных клеток и мазки из цервикального канала шейки матки и уретры у женщин, а у мужчин соскобы эпителиальных клеток и мазки отделяемого из уретры.

Сравнительную оценку эффективности выделения штаммов *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* и определения их АЧ проводили с использованием наборов реагентов, разработанных нами, и зарубежных аналогов («Mycofast Evolution 3», «EliTech», Франция; «Mycoplasma IST 2», «BioMerieux», Франция). Для этого исследовали клинические изоляты *M. hominis* (n=26) и *Ureaplasma spp.* (n=25). Все изоляты дали положительный результат при их исследовании методом ПЦР-РВ.

В опытах по выбору селективных компонентов (СК) для питательных сред использовали следующие АБП: амфотерицин В, флуконазол, амикацин, ванкомицин, ко-тримоксазол, амоксиклав, цефтриаксон. Чувствительность *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* определяли к 19-ти АБП различных групп: тетрациклин (ТЕТ), доксициклин (ДОК), эритромицин (ЭРИ), кларитромицин (КТМ), рокситромицин (РОК), азитромицин (АЗМ), джозамицин (ДЖМ), мидекамицин (МДМ), спирамицин (СПМ), офлоксацин (ОФ), ципрофлоксацин (ЦИП), пефлоксацин (ПЕФ), спарфлоксацин (СПФ), левофлоксацин (ЛВФ), моксифлоксацин (МОК), ломефлоксацин (ЛОМ), клиндамицин (КЛ) и линкомицин (ЛИН), гентамицин (ГЕН).

#### Микробиологические методы исследования:

Культуральная диагностика *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* проводилась на разработанных нами жидких питательных средах «МИКОПЛАЗМА-50» (ФСР 2009/05983) и «УРЕАПЛАЗМА-50» (ФСР 2009/05984). Для культуральных исследований по выявлению и определению АЧ *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* использовали разработанные нами наборы «МИКОПЛАЗМА-АЧ» (ФСР 2009/05985) и «УРЕАПЛАЗМА-АЧ» (ФСР 2009/05986), а также универсальную питательную среду, входящую в наборы «УРЕА/МИКО-СКРИН-2» (ФСР 2009/05987) и «УРЕА/МИКО-СКРИН-АЧ» (заявка на патент №2014114705 от 11.04.14). Культивирование микоплазм проходило при температуре 37 °С в течение 24-72 ч для *M. hominis* и 24-48 ч для *Ureaplasma spp.* Результаты исследования оценивали визуально по изменению цвета сред.

Определение чувствительности *M. hominis* (n=46) и *Ureaplasma spp.* (n=31) к АБП различных групп проводилось методом серийных микроразведений в жидкой питатель-

ной среде путем определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) согласно методическим рекомендациям МУК 4.2.1890-04 и рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standarts Institute, CLSI, M43-A).

#### Молекулярно-генетические методы исследования:

При исследовании клинического материала на выявляемость *M. hominis* (*Ureaplasma spp.*) помимо КМ применяли метод ПЦР-РВ. Использовали наборы реагентов «АмплиСенс *Ureaplasma spp.*-скрин-титр-FL» (ФСР 2012/13533) и «АмплиСенс *M. hominis*-скрин-титр-FL» (ФСР 2012/13539), ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва. Постановка реакции амплификации и детекция результатов проводились на устройстве для обнаружения специфической последовательности нуклеиновых кислот «АНК-32» (ФС 022а2005/2163-05), Россия. Постановка исследований осуществлялась согласно прилагаемым инструкциям.

#### Статистические методы исследования:

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ STATISTICA 8 (StatSoft, Inc., США). Для описания полученных результатов использовались стандартные методы непараметрической статистики. Гипотезы рассматривались как статистически достоверные при  $p < 0,05$ . Данные возрастов обследованных мужчин и женщин представлены в виде медианы с указанием первого и третьего квартиля  $Me [Q1; Q3]$ . Статистический анализ результатов по выявляемости *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* КМ и методом ПЦР-РВ осуществляли с применением непараметрических методов (Хи-квадрат и критерия Фишера). Оценка 95% доверительных интервалов (ДИ) произведена по Клопперу-Пирсону.

#### **Личное участие автора в получении результатов**

Автором составлен план исследования, проведен аналитический обзор литературы. Подбор СК для питательных сред, разработка универсальной питательной среды для выявления *M. hominis* и *Ureaplasma spp.*, подбор антибиотиков, специфических реагентов и условий их сорбции на стрипы, входящие в состав трех наборов реагентов, лично выполнено автором. Разработка питательных сред для выявления *M. hominis* (*Ureaplasma spp.*), транспортной среды проведена совместно со с.н.с. лаборатории биопрепаратов ФБУН НИИЭМ им. Пастера, к.б.н. Рока В.В. Разработка защитной среды для лиофилизации штаммов микоплазм осуществлялась с магистрантом СПбГТИ (ТУ) Дедовой Е.С. Все ПЦР-исследования по выявляемости микоплазм проходили в лаборатории иммунологии

ФБУН НИИЭМ им. Пастера совместно с в.н.с., к.м.н. Закревской А.В. и в.н.с., д.м.н. Куляшовой Л.Б.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации, заключалось в выполнении всех культуральных исследований, сравнительном изучении чувствительности урогенитальных микоплазм к АБП, теоретическом обобщении и анализе полученных результатов, статистической обработке данных.

### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту**

1. Разработанные селективные питательные среды позволяют выявлять *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* и определять их количественное содержание в биоматериале, а разработанная универсальная питательная среда дает возможность проводить одновременное выявление и количественное определение *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* в лунках стрипов с сорбированными в них специфическими субстратами.

2. На основании установленных минимальных подавляющих концентраций 19 антибиотиков разработаны три набора реагентов для определения антибиотикочувствительности *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* с использованием полученных селективных питательных сред.

3. Совпадение результатов по выявляемости возбудителей культуральным методом и методом ПЦР составляет 97,5% для *Ureaplasma spp.* и 93,5% для *M. hominis*, а разработанные наборы реагентов для определения антибиотикочувствительности сравнимы по эффективности с наборами зарубежных аналогов.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

О достоверности результатов работы свидетельствует использование как классического метода исследования – культуральной диагностики, которая является «золотым стандартом» при исследовании микоплазменных инфекций, так и современного молекулярно-генетического метода исследования – ПЦР. Достоверность полученных данных основана на большом объеме исследованного материала, воспроизводимости результатов и основных характеристик на каждом этапе разработки питательных сред и диагностических наборов согласно научно-технической документации, таких как стерильность, специфичность, селективность. Экспериментальные данные подвергнуты статистической обработке.

Диссертация апробирована на заседании Ученого совета Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпиде-

миологии и микробиологии им. Пастера» (протокол № 11 от 24 декабря 2014 г.).

Основные результаты исследований были представлены на Международной конференции «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций», 5-7 июня 2013 г., Санкт-Петербург; Научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации», 23-25 апреля 2014 г., Санкт-Петербург; VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины», 22-24 октября 2014 г., Ставрополь; Международной научно-практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы», 1-3 декабря 2014 г., Саратов.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых изданиях, 1 - в другом издании, 7 - в материалах российских и международных научно-практических конференций.

### **Структура и объем диссертации**

Основной текст диссертации изложен на 141 страницах машинописного текста, состоит из введения, одной главы с обзором литературы, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки, списка сокращений, списка литературы и приложений. Диссертация иллюстрирована 24 таблицами и 10 рисунками. Список литературы содержит 109 источников, в том числе, 63 - отечественных и 46 - зарубежных авторов.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. Разработка селективных питательных сред для выявления *M. hominis* и *Ureaplasma spp.***

#### **Подбор ростовых компонентов для питательной основы сред**

На первом этапе для подбора оптимального состава ростовых и селективных компонентов питательных сред для выявления *M. hominis* (и для выявления *Ureaplasma spp.*) использовали рецептуры, ранее разработанные, но не зарегистрированные лабораторией биопрепаратов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (Рока В.В., 2005 г.). Питательные среды были приготовлены на основе плацентарного бульона (50,0% (объем/объем)) (Лабинская А.С., 1978 г.). Для оптимизации состава ростовых компонентов питательной основы сред использовали клинические изоляты *Ureaplasma*

*spp.* (n=30) и *M. hominis* (n=30) и эталонные штаммы *M. hominis* (H-34) и *U. urealyticum* (серотип 8). Концентрации всех микоплазм находились в пределах  $10^4$  -  $10^5$  КОЕ/мл.

В серии предварительных опытов изучали влияние PPLO-бульона (Pronadisa, Laboratorios CONDA, ЗАО «ДиаКон»), пептона ферментативного (HiMedia Laboratories Pvt Ltd), хлорида натрия (ООО «НеваРеактив») и плацентарного бульона на рост *M. hominis* и *Ureaplasma spp.*, а также мочевины (SERVA) на рост *Ureaplasma spp.* Затем экспериментально были подобраны концентрации лошадиной сыворотки (ООО «БиолоТ») и желатиноля (раствор желатина 8,0%-ный) (ООО «Самсон-Мед»).

Результаты проведенных исследований показали, что в питательной среде для выявления *M. hominis* оптимальное соотношение PPLO бульона, лошадиной сыворотки и желатиноля было 1,8% (вес/объем), 10,0% (объем/объем) и 2,0% (объем/объем), соответственно. В питательной среде для выявления *Ureaplasma spp.* оптимальное соотношение компонентов составило: пептона ферментативного – 0,8% (вес/объем), хлорида натрия – 0,4% (вес/объем), плацентарного бульона – 40,0% (объем/объем), мочевины – 0,1% (вес/объем), лошадиной сыворотки – 10,0% (объем/объем) и желатиноля – 4,0% (объем/объем). При выбранных составах питательных сред жизнеспособность всех штаммов микоплазм сохранялась после второго пересева, при этом концентрации оставались в пределах  $10^4$  -  $10^5$  КОЕ/мл.

### **Повышение селективности питательных сред**

Для повышения селективных свойств питательной среды необходимо обеспечить подавление роста посторонней микрофлоры, потенциально содержащейся в исследуемом материале, без потери ростовых свойств для «целевого» микроорганизма. Для подавления роста грибов были изучены амфотерицин В и флуконазол, а в качестве антибактериальных компонентов – амикацин, ванкомицин, ко-тримоксазол, амоксицилин, цефтриаксон. Для оптимизации количественных соотношений СК использовали коллекционные штаммы *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и клинические изоляты *M. hominis* (n=23) и *Ureaplasma spp.* (n=27). Определение чувствительности культур к СК проводилось методом серийных разведений в жидкой питательной среде путем определения МПК. В каждую пробирку с различными разведениями СК (от 128 мкг/мл до 0,06 мкг/мл) вносили суточные культуры *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* в концентрации  $10^4$  КОЕ/мл, штаммы *M. hominis* или *Ureaplasma spp.* с титром в пределах  $10^4$  -  $10^5$  КОЕ/мл. Все пробирки инкубировали в течение 72 ч при температуре 37 °С. Затем

делали высеив из каждой пробирки на плотные питательные среды и оценивали результат по наличию или отсутствию роста колоний соответствующей культуры (Таблица 1).

Анализ экспериментальных данных показал, что амикацин имеет высокую анти-микробную активность, но в высоких концентрациях подавляет рост некоторых штаммов *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* Амоксиклав проявил высокую активность по отношению к *S. aureus* и *E. coli*, ванкомицин и Ко-тримоксазол – к *S. aureus*, а цефтриаксон – в отношении всех культур. Данные АБП не подавляли рост *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* во всех исследованных концентрациях достоверно ( $p \geq 0,05$ ), не имея отличий от роста *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* на средах без АБП. Амфотерицин В был активен в отношении *C. albicans*, но в больших концентрациях подавлял рост микоплазм. Флуконазол же оказался достаточно активным антимикотиком и не подавлял рост микоплазм.

Таблица 1 – Чувствительность микроорганизмов к селективным компонентам в жидких питательных средах для выявления *M. hominis* (для выявления *Ureaplasma spp.*)

СК	МПК, мкг/мл					
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. hominis</i> (n=23)	<i>Ureaplasma</i> <i>spp.</i> (n=27)
Ванкомицин	+	1,0	+	н.д. <sup>2</sup>	+	+
Цефтриаксон	0,5	0,5	32,0	н.д.	+	+
Амоксиклав	16,0	0,25	+	н.д.	+	+
Амикацин	16,0	64,0	8,0	н.д.	+ <sup>3</sup>	+ <sup>4</sup>
Ко-тримоксазол	+	4,0	+	н.д.	+	+
Амфотерицин В	н.д.	н.д.	н.д.	5,0	+ <sup>5</sup>	+ <sup>6</sup>
Флуконазол	н.д.	н.д.	н.д.	20,0	+	+
0 (К) <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+

Примечание: «+» - СК не подавляет рост микроорганизма; <sup>1</sup> – питательная среда без АБП (контрольная); <sup>2</sup> – нет данных; <sup>3</sup> – к амикацину некоторые изоляты *M. hominis* были чувствительны (МПК=32,0 мкг/мл для n=8; МПК=64,0 мкг/мл для n=10); <sup>4</sup> - к амикацину некоторые изоляты *Ureaplasma spp.* были чувствительны (МПК=32,0 мкг/мл для n=9; МПК=64,0 мкг/мл для n=12); <sup>5</sup> – амфотерицин В подавляет рост *M. hominis* (МПК=40,0 мкг/мл для n=4; МПК=80,0 мкг/мл для n=6; МПК=160,0 мкг/мл для n=5; МПК=320,0 мкг/мл для n=8); <sup>6</sup> - амфотерицин В подавляет рост *Ureaplasma spp.* (МПК=40,0 мкг/мл для n=5; МПК=80,0 мкг/мл для n=9; МПК=160,0 мкг/мл для n=7; МПК=320,0 мкг/мл для n=6).

В результате исследований в качестве СК для жидких питательных сред были выбраны следующие препараты: цефтриаксон (64,0 мг/л), амоксиклав (16,0 мг/л), ванкомицин (2,0 мг/л), флуконазол (20,0 мг/л). Для дифференциации микоплазм в питательную среду для выявления *M. hominis* ввели КТМ (4,0 мг/л), который подавляет

рост *Ureaplasma spp.* и др. микоплазм, но не активен в отношении *M. hominis*. В питательную среду для выявления *Ureaplasma spp.* ввели ЛИН (16,0 мг/л), который подавляет рост *M. hominis* и др. микоплазм, но не активен в отношении *Ureaplasma spp.*

### Оценка ростовых и селективных свойств разработанных питательных сред

В исследовании по оценке ростовых и селективных свойств разработанных питательных сред использовали клинические изоляты *M. hominis* (n=33) и *Ureaplasma spp.* (n=36) в концентрации  $10^4$  -  $10^5$  КОЕ/мл, а также суточные культуры эталонных штаммов *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *C. albicans* в концентрации  $10^4$  КОЕ/мл. По истечении времени культивирования оценивали визуально смену цвета питательных сред. Затем из каждой пробирки делали высев (Таблица 2) на плотные питательные среды для идентификации и подсчета выросших колоний.

По результатам исследования определено, что разработанные питательные среды «МИКОПЛАЗМА-50» и «УРЕАПЛАЗМА-50» обеспечивают необходимые ростовые и селективные свойства для выявления *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* Подобранные СК в рецептуре питательных сред ингибируют рост посторонней микрофлоры. По данным подсчета колоний концентрации микоплазм после инкубации были в пределах  $10^4$  –  $10^5$  КОЕ/мл, то есть питательные среды обеспечивают оптимальные условия для их роста.

Таблица 2 – Исследование ростовых и селективных свойств жидких питательных сред для выявления *M. hominis* (для выявления *Ureaplasma spp.*)

Наименование микроорганизмов	Количество штаммов	Количество штаммов, выросших в питательной среде для выявления <i>M. hominis</i>		Количество штаммов, выросших в питательной среде для выявления <i>Ureaplasma spp.</i>	
		Абс.	%	Абс.	%
<i>E. coli</i>	1	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	1	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	1	0	0	0	0
<i>M. hominis</i>	33	33	100	0	0
<i>Ureaplasma spp.</i>	36	0	0	36	100

### Разработка защитной, транспортной и универсальной сред

При разработке защитной среды, используемой при лиофилизации штаммов *M. hominis* и *Ureaplasma spp.*, в качестве криопротекторов были изучены следующие препараты: концентрированная сахарозо-желатиновая среда (КЖС), желатиноль, сахароза, лошадиная сыворотка, глицерин, диметилсульфоксид. Всего было подобрано и исследовано 84 состава защитных сред. Для проверки жизнеспособности микоплазм лиофилизированные

защитные среды с возбудителями растворяли в дистиллированной воде и пересевали на питательные среды «МИКОПЛАЗМА-50» («УРЕАПЛАЗМА-50»). После инкубации делали высеив из каждой пробирки на плотную питательную среду. Наиболее подходящим составом для защитной среды стало сочетание 20,0% лошадиной сыворотки с 10,0% КЖС.

Транспортная среда была разработана на основе питательной среды для выявления *Ureaplasma spp.* «УРЕАПЛАЗМА-50», из состава которой исключили рН-индикаторы, мочевины и СК, подавляющий рост *Ureaplasma spp.* (ЛИН). Специфичность транспортной среды оценивали путем посева в нее клинических изолятов *M. hominis* (n=10) и *Ureaplasma spp.* (n=10) в концентрациях  $10^4 - 10^5$  КОЕ/мл. После инкубации делали высеив из пробирок на плотные среды. В результате исследования можно сделать вывод, что транспортная среда обеспечивает необходимую жизнеспособность для урогенитальных микоплазм в течение 24 часов, так как концентрации всех штаммов *M. hominis* (*Ureaplasma spp.*) были в пределах  $10^4 - 10^5$  КОЕ/мл, как и перед внесением инокула.

Для одновременного выявления *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* была разработана универсальная питательная среда, позволяющая проводить анализ в лунках стрипов с сорбированными в них специфическими субстратами. В качестве специфических субстратов служат ингредиенты, играющие роль ростовых факторов, а также АБП, подавляющие рост других микоплазм. На рисунке 1 представлена схема проведения анализа с использованием универсальной среды и стрипов.

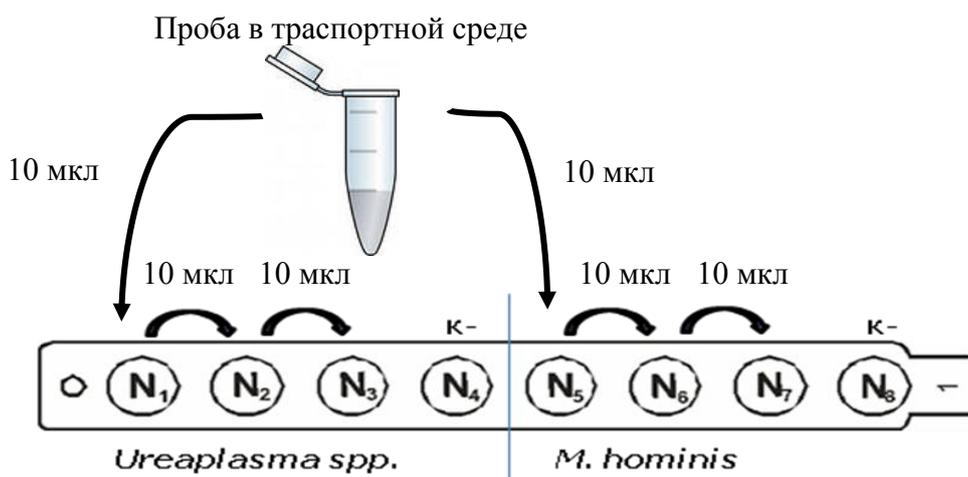


Рисунок 1 – Проведение анализа на наборе «УРЕА/МИКО-СКРИН-2» с использованием универсальной среды и стрипов

Примечание: 1) Универсальная среда в объеме 100 мкл вносится во все лунки до проведения анализа; 2) Лунки N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub> и N<sub>5</sub>, N<sub>6</sub>, N<sub>7</sub> предназначены для десятикратных разведений исследуемого материала в среде.

Данная среда была разработана на основе двух сред «УРЕАПЛАЗМА-50» и «МИКОПЛАЗМА-50», питательные компоненты которых вошли в шесть опытных составов: 1) плацентарный бульон 100% (400 мл); 2) плацентарный бульон 100% (400 мл) + PPLO бульон 100% (18 г); 3) плацентарный бульон 40% (160 мл) + PPLO бульон 60% (10,8 г); 4) плацентарный бульон 50% (200 мл) + PPLO бульон 50% (9 г); 5) плацентарный бульон 60% (240 мл) + PPLO бульон 40% (7,2 г); 6) PPLO бульон 100% (18 г). Ростовые свойства опытных сред в стрипах исследовались на клинических изолятах *M. hominis* (n=10) и *Ureaplasma spp.* (n=10) в концентрациях  $10^4 - 10^5$  КОЕ/мл. После инкубации из каждой лунки стрипа делали высев на плотную питательную среду. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Ростовые свойства опытных универсальных сред

№	Варианты опытных сред	Количество <i>Ureaplasma spp.</i> , выросших на среде (n=10)				Количество <i>M. hominis</i> , выросших на среде (n=10)			
		Отсутствие роста	10 <sup>2</sup> КОЕ/мл	10 <sup>3</sup> КОЕ/мл	≥10 <sup>4</sup> КОЕ/мл	Отсутствие роста	10 <sup>2</sup> КОЕ/мл	10 <sup>3</sup> КОЕ/мл	≥10 <sup>4</sup> КОЕ/мл
1	На основе «УРЕАПЛАЗМА-50» (100% плацентарный бульон)	-	-	-	10 (100%)	4 (40%)	6 (60%)	-	-
2	На основе «УРЕАПЛАЗМА-50» и «МИКОПЛАЗМА-50» (100% плацентарный бульон + 100% PPLO)	-	-	1 (10%)	9 (90%)	-	-	-	10 (100%)
3	На основе «УРЕАПЛАЗМА-50» и «МИКОПЛАЗМА-50» (40% плацентарный бульон + 60% PPLO)	-	-	-	10 (100%)	-	-	-	10 (100%)
4	На основе «УРЕАПЛАЗМА-50» и «МИКОПЛАЗМА-50» (50% плацентарный бульон + 50% PPLO)	-	4 (40%)	5 (50%)	1 (10%)	-	-	-	10 (100%)
5	На основе «УРЕАПЛАЗМА-50» и «МИКОПЛАЗМА-50» (60% плацентарный бульон + 40% PPLO)	-	2 (20%)	5 (50%)	3 (30%)	-	-	3 (30%)	7 (70%)
6	На основе «МИКОПЛАЗМА-50» (100% PPLO)	5 (50%)	4 (40%)	1 (10%)	-	-	-	-	10 (100%)

По результатам исследования была выбрана универсальная среда №3. Все клинические изоляты *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* на данной среде выросли в концентрации  $10^4 - 10^5$  КОЕ/мл.

## 2. Изучение чувствительности к антибактериальным препаратам *M. hominis* и *Ureaplasma spp.*

Определение АЧ *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* проводилось методом серийных разведений в жидкой питательной среде путем определения МПК. Для этих опытов питательные среды были приготовлены без добавления КТМ и ЛИН в качестве СК. Исследовались клинические изоляты *M. hominis* (n=45) и *Ureaplasma spp.* (n=30), а также эталонные штаммы *M. hominis* (Н-34) и *U. urealyticum* (серотип 8). К 19 АБП различных групп проводили определение МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub> (Таблица 4).

Диапазон двукратных разведений АБП, сорбированных на планшетах, располагался в интервале концентраций: ● 64,0-0,06 мкг/мл - для ТЕТ, ЭРИ, КТМ, АЗМ, РОК, СПМ, ОФ, ЦИП, ЛВФ, ПЕФ, ЛОМ, КЛ, ЛИН и ГЕН; ● 16,0-0,02 мкг/мл для ДОК, ДЖМ, МДМ, СПФ и МОК. Штаммы с концентрацией в пределах 10<sup>4</sup> - 10<sup>5</sup> КОЕ/мл вносили в объеме 100 мкл в каждую лунку планшета с сорбированными АБП и инкубировались анаэробно при температуре 37 °С с добавлением вазелинового масла.

Таблица 4 – Чувствительность *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* к различным антибактериальным препаратам

АНТИБИО-ТИКИ	<i>M. hominis</i> (n=46), МПК (мкг/мл)			<i>Ureaplasma spp.</i> (n=31), МПК (мкг/мл)		
	диапазон	МПК <sub>50</sub>	МПК <sub>90</sub>	диапазон	МПК <sub>50</sub>	МПК <sub>90</sub>
Доксициклин	0,03 - 4,0	0,12	2,0	0,03 - 32,0	0,25	2,0
Тетрациклин	0,25 - 32,0	0,5	2,0	0,06 - 64,0	1,0	4,0
Эритромицин	>64,0	>64,0	>64,0	0,06 - 16,0	0,5	2,0
Кларитромицин	32,0 - >64,0	>64,0	>64,0	0,06 - 16,0	0,06	0,12
Джозамицин	0,02 - 8,0	0,25	2,0	0,03 - 4,0	0,25	1,0
Мидекамицин	0,06 - 16,0	8,0	16,0	0,06 - 16,0	2,0	8,0
Азитромицин	2,0 - >64,0	64,0	>64,0	0,06 - 2,0	0,5	1,0
Рокситромицин	32,0 - >64,0	>64,0	>64,0	0,06 - 2,0	0,5	1,0
Спирамицин	16,0 - >64,0	>64,0	>64,0	4,0 - >64,0	32,0	>64,0
Офлоксацин	0,25 - 16,0	1,0	8,0	0,25 - 32,0	1,0	4,0
Ципрофлоксацин	0,12 - 8,0	1,0	4,0	0,25 - 32,0	4,0	16,0
Спарфлоксацин	0,02 - 8,0	0,12	0,5	0,12 - 8,0	1,0	2,0
Левифлоксацин	0,12 - 16,0	0,5	4,0	0,25 - 4,0	1,0	2,0
Моксифлоксацин	0,02 - 8,0	0,06	0,5	0,06 - 4,0	0,25	2,0
Пефлоксацин	0,25 - 32,0	2,0	16,0	0,5 - 32,0	4,0	8,0
Ломефлоксацин	0,5 - 32,0	2,0	8,0	1,0 - 64,0	4,0	16,0
Клиндамицин	0,06 - >64,0	1,0	16,0	0,5 - >64,0	32,0	>64,0
Линкомицин	0,12 - >64,0	1,0	16,0	4,0 - >64,0	64,0	>64,0
Гентамицин	0,5 - 32,0	2,0	8,0	0,5 - 32,0	4,0	8,0

Результаты определения чувствительности *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* интерпретировали согласно стандартным критическим значениям для нескольких АБП, рекомен-

двум CLSI, где штаммы расценивались как S – чувствительные и R – резистентные (Таблица 5). Таким образом, можно сказать, что наиболее активными АБП в отношении как *M. hominis*, так и *Ureaplasma spp.* является группа тетрациклинов и фторхинолонов, а для *Ureaplasma spp.* также группа макролидов. Самым неактивным антибиотиком для *M. hominis* и *Ureaplasma spp.*, по сравнению со всеми изученными, был СПМ. Результаты, полученные в проведенных исследованиях, были использованы при разработке наборов для определения АЧ к *M. hominis* и *Ureaplasma spp.*

Таблица 5 – Доля чувствительных штаммов *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* согласно критериям CLSI

Антибактериальные препараты	Чувствительные штаммы (%) по CLSI (М 43-А)	
	<i>M. hominis</i>	<i>Ureaplasma spp.</i>
Тетрациклин	93,5	51,6
Эритромицин	н.д.	96,8
Левифлоксацин	73,9	90,3
Моксифлоксацин	89,1	90,3
Клиндамицин	17,4	н.д.

При создании диагностических наборов, предназначенных для выявления *M. hominis* (либо *Ureaplasma spp.*) и оценки их количественного содержания в биоматериале, а также для определения АЧ к двенадцати АБП, использовали разработанные нами питательные среды «МИКОПЛАЗМА-50» и «УРЕАПЛАЗМА-50». Наборы представляют собой микротест-системы, где для каждого анализа предусмотрено использование одного 16-луночного стрипа. Выбор состава АБП и их концентраций для данных наборов («МИКОПЛАЗМА-АЧ» и «УРЕАПЛАЗМА-АЧ») осуществлялся в соответствии с результатами по изучению чувствительности *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* к АБП. Все АБП в данных наборах сорбированы в лунках стрипов в одной концентрации, позволяющей оценивать чувствительность микоплазм в двух категориях: чувствительные или резистентные. В стрипе предусмотрено проведение оценки концентрации возбудителя методом последовательных десятикратных разведений.

При разработке набора реагентов для одновременного выявления *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* и определения их АЧ к восьми АБП «УРЕА/МИКО-СКРИН-АЧ» использовали методику, разработанную ранее при создании набора «УРЕА/МИКО-СКРИН-2» для одновременного выявления *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* с помощью

универсальной питательной среды в лунках стрипов с сорбированными специфическими субстратами. Набор «УРЕА/МИКО-СКРИН-АЧ» представляет собой микротест-систему, в состав которой входит три 8-луночных стрипа. Один стрип, в лунках которого сорбированы специфические субстраты, предназначен для выявления и количественного определения содержания возбудителя в пробе. Второй стрип используется для определения АЧ *M. hominis* и третий стрип – для определения АЧ *Ureaplasma spp.* Для каждого возбудителя предложен свой набор АБП, которые сорбированы в лунках двух последних стрипов в одной концентрации, позволяющей оценивать чувствительность микоплазм в двух категориях: чувствительные или резистентные.

Определение активности специфических субстратов и АБП, сорбированных в лунках стрипов, проводилось путем посева в лунки стрипов всех наборов клинических изолятов *M. hominis* (n=10) и *Ureaplasma spp.* (n=10) с концентрациями в пределах  $10^4$  –  $10^5$  КОЕ/мл. После инкубации делали высев из каждой лунки на плотную питательную среду для морфологической идентификации и подсчета выросших колоний. Все штаммы выросли в пределах  $10^4$  –  $10^5$  КОЕ/мл, наблюдался четкий переход цвета в лунках стрипов, предназначенных для количественного определения микоплазм в исследуемом материале. На всех наборах наблюдались одинаковые результаты по АЧ.

### **3. Изучение диагностической эффективности разработанных питательных сред и наборов**

#### **Сравнение выявляемости микоплазменной инфекции КМ и методом ПЦР-РВ**

В данном исследовании использовался клинический материал от 277 человек (170 мужчин, 107 женщин), который был обследован на наличие ДНК *Ureaplasma spp.* и *M. hominis* методом ПЦР-РВ и КМ на разработанных нами селективных питательных средах «МИКОПЛАЗМА-50» и «УРЕАПЛАЗМА-50». Медиана возраста исследованных мужчин составила 32 [28;38] лет, а медиана возраста женщин 29 [25;33] лет.

В результате исследования методом ПЦР-РВ ДНК *Ureaplasma spp.* были обнаружены у 59 человек (21,3%), ДНК *M. hominis* – у 3 человек (1,1%), а ДНК двух возбудителей (*M. hominis* и *Ureaplasma spp.*) - у 23 человек (8,3%). При КМ рост *Ureaplasma spp.* наблюдался в 68 (24,6%) случаях. Рост *M. hominis* был обнаружен в 1 (0,4%) случае. Оба возбудителя (*M. hominis* и *Ureaplasma spp.*) обнаружены у 9 (3,3%) человек. Общее обнаружение *Ureaplasma spp.* в клиническом материале составило 82 случая (29,6%) при использовании метода ПЦР-РВ (95% ДИ по методу Клоппера-Пирсона 22,1% - 38,4%)

и 77 случаев (27,8%) при исследовании КМ (95% ДИ 20,6% - 36,3%). Достоверно значимых различий не выявлено [ $\chi^2=0,22$ ;  $p>0,05$ ]. Общее обнаружение *M. hominis* методом ПЦР-РВ составило 26 случаев (9,4%), а КМ – 10 случаев (3,6%). Значимость различий составила [ $\chi^2=7,61$ ;  $p=0,0058$ ].

Наиболее часто на питательных средах отмечался рост *Ureaplasma spp.* в диагностически значимом титре не менее  $10^4$  КОЕ/мл - в 70 из 77 положительных штаммов (90,9%). При диагностике методом ПЦР-РВ ДНК *Ureaplasma spp.* в количестве не менее  $10^4$  ГЭ/мл определялись в 70 из 82 положительных штаммов (85,4%). Достоверно значимых различий не выявлено [ $\chi^2=1,16$ ;  $p>0,05$ ]. Рост *M. hominis* на питательных средах в титре не менее  $10^4$  КОЕ/мл также наблюдался наиболее часто - в 9 из 10 положительных штаммов (90,0%). В ПЦР исследовании ДНК *M. hominis* в количестве не менее  $10^4$  ГЭ/мл определялись в 9 из 26 положительных образцов (34,6%). Значимость различий составила [ $\chi^2=7,61$ ;  $p=0,0029$ ].

Совпадение результатов между двумя методами (ПЦР-РВ и КМ) при обнаружении *Ureaplasma spp.* составило 97,5%, а при обнаружении *M. hominis* – 93,5% (Таблица 6).

Таблица 6 - Сравнение результатов по выявляемости *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* культуральным методом и методом ПЦР-РВ

Результаты	<i>Ureaplasma spp.</i>		<i>M. hominis</i>	
	Количество	%	Количество	%
КМ «+» ПЦР-РВ «+»	76	27,4	9	3,25
КМ «-» ПЦР-РВ «-»	194	70,0	250	90,25
Совпадение	270	97,5	259	93,5
КМ «+» ПЦР-РВ «-»	1	0,4	1	0,4
КМ «-» ПЦР-РВ «+»	6	2,2	17	6,1
Несовпадение	7	2,5	18	6,5

Проведенные исследования по выявляемости урогенитальных микоплазм КМ и методом ПЦР-РВ показали, что оба метода сравнимы по своей диагностической эффективности и могут быть использованы в практическом здравоохранении.

#### **4. Испытания разработанных наборов, предназначенных для выявления и определения антибиотикочувствительности урогенитальных микоплазм, в сравнение с зарубежными аналогами**

На основании положительных результатов ПЦР-РВ клинические изоляты *M. homi-*

*nis* (n=26) и *Ureaplasma spp.* (n=25) параллельно исследовали на разработанных нами наборах «МИКОПЛАЗМА-АЧ», «УРЕАПЛАЗМА-АЧ», «УРЕА/МИКО-СКРИН-АЧ» и наборах «Mycofast Evolution 3» («EliTech», Франция) и «Mycoplasma IST 2» («Bio-Merieux», Франция). Все исследования проводили согласно инструкциям по применению. Результаты сравнительных исследований представлены в таблицах 7 и 8.

Таблица 7 – Сравнение результатов по выявляемости *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* при использовании диагностических наборов различных производителей

Возбудители	Количество проверенных штаммов	Положительные результаты роста на проверяемых наборах									
		Уреаплазма-АЧ		Микоплазма-АЧ		Уреа/Мико-Скрин-АЧ		Mycofast Ev. 3		Mycoplasma IST 2	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<i>M. hominis</i>	26	0	0	24	92,3	24	92,3	23	88,5	20	76,9
<i>Ureaplasma spp.</i>	25	24	96,0	0	0	24	96,0	23	92,0	24	96,0

Таблица 8 – Сравнение результатов по антибиотикочувствительности *M. hominis* и *Ureaplasma spp.*

Возбудители	Антибиотики	Чувствительность изолятов к антибиотикам											
		Уреаплазма-АЧ		Микоплазма-АЧ		Уреа/Мико-Скрин-АЧ		Mycofast Ev. 3			Mycoplasma IST 2		
		Ч	Р	Ч	Р	Ч	Р	Ч	УЧ	Р	Ч	УЧ	Р
<i>M. hominis</i>	ДОК	-	-	24 (92,3%)	-	24 (92,3%)	-	23 (88,5%)	-	-	20 (76,9%)	-	-
	ОФ	-	-	19 (73,1%)	5 (19,2%)	19 (73,1%)	5 (19,2%)	18 (69,2%)	-	5 (19,2%)	15 (57,7%)	-	5 (19,2%)
	ЦИП	-	-	24 (92,3%)	-	24 (92,3%)	-	23 (88,5%)	-	-	20 (76,9%)	-	-
	ДЖМ	-	-	22 (84,6%)	2 (7,7%)	22 (84,6%)	2 (7,7%)	21 (80,8%)	2 (7,7%)	-	18 (69,2%)	2 (7,7%)	-
<i>Ureaplasma spp.</i>	ДОК	24 (96,0%)	-	-	-	24 (96,0%)	-	23 (92,0%)	-	-	24 (96,0%)	-	-
	ОФ	12 (48,0%)	12 (48,0%)	-	-	12 (48,0%)	12 (48,0%)	11 (44,0%)	-	12 (48,0%)	12 (48,0%)	-	12 (48,0%)
	АЗМ	21 (84,0%)	3 (12,0%)	-	-	21 (84,0%)	3 (12,0%)	20 (80,0%)	2 (8,0%)	1 (4,0%)	21 (84,0%)	1 (4,0%)	2 (8,0%)
	ДЖМ	22 (88,0%)	2 (8,0%)	-	-	22 (88,0%)	2 (8,0%)	21 (84,0%)	1 (4,0%)	1 (4,0%)	22 (88,0%)	-	2 (8,0%)

При сравнении результатов по определению АЧ, полученных на разработанных нами наборах реагентов и их зарубежных аналогах, различий в оценке чувствительности выявлено не было. Таким образом, проведенные исследования показали, что разработанные нами наборы для культуральной диагностики микоплазм и определения их АЧ, обладают высокой диагностической эффективностью.

## ВЫВОДЫ

1. Экспериментально определены оптимальные концентрации ростовых и селективных компонентов питательных сред для выявления урогенитальных микоплазм: мочевины – 0,1%, лошадиная сыворотка – 10,0%, плацентарный бульон – 40,0%, пептон ферментативный – 0,8%, линкомицин – 16 мг/л (для *Ureaplasma spp.*); лошадиная сыворотка – 10,0%, PPLO бульон – 1,8%, кларитромицин – 4 мг/л (для *M. hominis*). Концентрации селективных компонентов для питательных сред: цефтриаксон – 64 мг/л, амоксициллин – 16 мг/л, ванкомицин – 2 мг/л, флуконазол – 20 мг/л.

2. Научно доказаны и экспериментально обоснованы оптимальные составы защитной среды для сохранения жизнеспособности *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* при их лиофилизации; транспортной среды для сохранения жизнеспособности урогенитальных микоплазм в течение 24 часов и универсальной питательной среды для их одновременного обнаружения.

3. Определение минимальных подавляющих концентраций для 19 антибиотиков показало, что группа тетрациклинов обладает высокой активностью к урогенитальным микоплазмам, а активность тетрациклина к *Ureaplasma spp.* оказалась умеренной. Практически все фторхинолоны показали достаточно высокую активность к *Ureaplasma spp.*, как и макролиды, кроме спирамицина и мидекамицина. Для *M. hominis* наиболее активным из макролидов был джозамицин. Из фторхинолонов наибольшую активность к *M. hominis* проявили спарфлоксацин и моксифлоксацин. На основе полученных данных разработаны три диагностических набора, предназначенных для определения антибиотикочувствительности *M. hominis* и *Ureaplasma spp.*

4. Совпадение результатов по выявляемости возбудителей культуральным методом на разработанных питательных средах и методом полимеразной цепной реакции составляет 97,5% для *Ureaplasma spp.* и 93,5% для *M. hominis*.

5. Выявление *M. hominis* на разработанных нами наборах «МИКОПЛАЗМА-АЧ» и «УРЕА/МИКО-СКРИН-АЧ» составило 92,3%, а на наборе «Mycofast Evolution 3» 88,5% и 76,9% – на наборе «Mycoplasma IST 2». Результаты по выявлению *Ureaplasma spp.* совпали на наборах «УРЕАПЛАЗМА-АЧ», «УРЕА/МИКО-СКРИН-АЧ» и «Mycoplasma IST 2» и составили 96,0%, а на наборе «Mycofast Evolution 3» выявление было 92,0%. При сравнении антибиотикочувствительности на данных наборах наблюдалось совпадение результатов.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанные питательные среды и наборы реагентов предназначены для использования специалистами медицинских учреждений в области клинической лабораторной диагностики и микробиологии. Комплекс диагностических наборов включает в себя селективную питательную среду для выявления *M. hominis*, селективную питательную среду для выявления *Ureaplasma spp.*, универсальную питательную среду для одновременного выявления *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* и транспортную питательную среду для урогенитальных микоплазм, а также три набора реагентов, предназначенных для определения антибиотикочувствительности данных микоплазм, позволяющих проводить диагностику микоплазменных инфекций от этапа выявления возбудителя до выбора лекарственного препарата для лечения.

2. Подобранный состав защитной среды может быть использован для лиофилизации других видов микоплазм и сохранении их жизнеспособности при длительном хранении.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Планируется продолжить сбор данных по чувствительности клинических изолятов *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* к антибактериальным препаратам разных групп, которые в дальнейшем можно использовать при разработке критериев чувствительности урогенитальных микоплазм.

2. Дальнейшие исследования будут направлены на разработку питательных сред для диагностики микоплазменных инфекций другой этиологии (*M. genitalium*), основой которых станут полученные оптимальные составы селективных питательных сред для выявления *M. hominis* и *Ureaplasma spp.*

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Заручейнова, О.В. Повышение селективности питательных сред для культивирования урогенитальных микоплазм: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* / О.В. Заручейнова, В.В. Рока, В.Н. Вербов // Материалы IX съезда всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – М., 2007. – С. 29-30.
2. Заручейнова, О.В. Набор реагентов для выделения, идентификации, полуколичественной оценки и определения антибиотикочувствительности урогенитальных микоплазм: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* / О.В. Заручейнова, В.Н. Семенов, В.В. Рока, В.Н. Вербов // Развитие научных исследований и надзор за инфекционными заболеваниями: материалы международной конференции / Под ред. А.Б. Жебруна. – СПб.: ФГУН НИИЭМ имени Пастера Роспотребнадзора, 2010. – С. 116-117.

3. Заручейнова, О.В. Сравнительная оценка активности антибиотиков фторхинолонового ряда по отношению к урогенитальным микоплазмам: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* / О.В. Заручейнова, В.Н. Семенов, В.В. Рока, В.Н. Вербов // Развитие научных исследований и надзор за инфекционными заболеваниями: материалы международной конференции / Под ред. А.Б. Жебруна. – СПб.: ФГУН НИИЭМ имени Пастера Роспотребнадзора, 2010. – С. 117.
4. Заручейнова, О.В. Одновременное выявление и определение антибиотикочувствительности *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* / О.В. Заручейнова, В.В. Рока, В.Н. Вербов // Инфекция и иммунитет. Материалы международной конференции «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций» / Под ред. А.Б. Жебруна. – СПб.: ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 2013. – Том 3, № 2. – С. 130.
5. Заручейнова, О.В. Сравнительная оценка чувствительности урогенитальных микоплазм *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.* к антимикробным препаратам / О.В. Заручейнова, В.Н. Вербов, Н.В. Семенов // Инфекция и иммунитет. Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации» / Под ред. А.Б. Жебруна. – СПб.: ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 2014. – Том 4, №1. – С. 67.
6. **Заручейнова, О.В. Оценка чувствительности урогенитальных микоплазм *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.* к антибактериальным препаратам в испытаниях *in vitro* / О.В. Заручейнова, В.Н. Вербов, Н.В. Семенов // Практическая медицина. – 2014. – Том 79, №3. – С. 181-186.**
7. Заручейнова, О.В. Апробация наборов для выявления *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* и определения их антибиотикочувствительности / О.В. Заручейнова, А.В. Закревская, Л.Б. Куляшова, В.В. Рока, В.Н. Вербов // Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины: Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора / Под ред. А.Н. Куличенко. – Ставрополь: Издательство ООО «Экспо-Медиа», 2014. – С. 120-121.
8. Заручейнова, О.В. Диагностическая значимость наборов для выявления урогенитальных микоплазм и определения их антибиотикочувствительности / О.В. Заручейнова, В.Н. Вербов, А.В. Закревская, Л.Б. Куляшова, В.В. Рока // Журнал международной медицины. – 2014. – Том 10, № 5. – С. 45-48.
9. Заручейнова, О.В. Разработка и апробация наборов реагентов для выявления и определения антибиотикочувствительности *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.* / О.В. Заручейнова, А.В. Закревская, Л.Б. Куляшова, В.В. Рока, В.Н. Вербов //

Биотехнология: реальность и перспективы. Материалы Международной научно-практической конференции. – Саратов: ИЦ «Наука», 2014. – С. 132-135.

10. Заручейнова, О.В. Методы лабораторной диагностики урогенитальных инфекций, ассоциированных с *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.* / О.В. Заручейнова // Инфекция и иммунитет. – 2014. – Том 4, № 4. – С. 331-338.

11. Заручейнова, О.В. Сравнение выявляемости микоплазменной инфекции культуральным методом и методом полимеразной цепной реакции / О.В. Заручейнова, А.В. Закревская, Л.Б. Куляшова, В.В. Рока, В.Н. Вербов, А.Б. Жебрун // Профилактическая и клиническая медицина. – 2014. – Том 53, № 4. – С. 118-123.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АБП – антибактериальные препараты

АЧ – антибиотикочувствительность

ГЭ – геномный эквивалент

КЖС – концентрированная желатино-сахарозная среда

КМ – культуральный метод

КОЕ – колониеобразующие единицы

КРС – крупный рогатый скот

МПК – минимальная подавляющая концентрация

МПК<sub>50</sub> – МПК для 50% исследованных штаммов

МПК<sub>90</sub> – МПК для 90% исследованных штаммов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме «реального времени»

СК – селективный компонент

CLSI – (Clinical and Laboratory Standards Institute) – Институт клинических и лабораторных стандартов

PPLO – (pleuropneumonia-like-organisms) — возбудители плевропневмонии крупного рогатого скота

Автор выражает глубокую благодарность заведующему лабораторией биопрепаратов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, к.х.н. Вербову В.Н. за оказанную помощь и ценные советы при выполнении данной работы.