

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ИНСТИТУТ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ
ВРАЧЕЙ
МИНИСТЕРСТВО ОБОРОНЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Кафедра дерматовенерологии

«УТВЕРЖДАЮ»

**Начальник кафедры дерматовенерологии,
полковник медицинской службы, доцент**

_____ В.Гладько

« _____ » _____ 2002 год

Кандидат медицинских наук, Н.Н. Кахишвили

**ЛЕКЦИЯ: «МИКОПЛАЗМОЗ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ
ПРОБЛЕМЫ ЭТИОПАТОГЕНЕЗА, КЛИНИКИ, ДИАГНОСТИКИ И
ЛЕЧЕНИЯ»**

**Обсуждена на заседании предметно-методической
комиссии кафедры
Протокол N _____**

г. Москва 2002 г

ВВЕДЕНИЕ

УЧЕБНЫЕ ВОПРОСЫ

- Биология микоплазм
- Особенности микоплазменных инфекций
- Урогенитальные микоплазмозы
- *M. hominis*. Биология.
- *U. urealyticum*. Биология.
- *M. genitalium*. Биология.
- *M. fermentans*. Биология.
- эпидемиология
- патогенность
- клинические проявления
- лечение
- Диагностика микоплазменных инфекций
- исследуемый материал
- культуральные методы
- наиболее часто используемые серологические методы:
- выявление антигенов
- выявление антител
- молекулярно-биологические методы
- сравнение чувствительности методов
- трактовка результатов
- достоинства и недостатки диагностических методов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева Е.В. и др. Оценка этиологической роли микоплазм, уреоплазм и хламидий в развитии воспалительных заболеваний урогенитального тракта. // Опыт диагностики и лечения больных /ЦКБ МПС России,- М. 1997, стр. 125 - 127.

2 Герасимова Н.М. и др. Применение кларитромицина (кларитромицин) в терапии больных с урогенитальным хламидиозом и уреоплазмозом.// Акт. Вопр. Инфекций, передаваемых половым путем, у детей, подростков и беременных. Уральск. НИИ Дерматовенерологии МЗ РФ, 1999, стр. 185-186.

3. Игнатова И.Г. и др. Опыт применения циклоферона в лечении урогенитальных микоплазмозов. // Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы дерматовенерологии», Кемерово, 1998, стр. 18-19.

4. Кузнецов В.П. и др. Инфекционные агенты в этиологии хронических сальпингоофоритов в разработке комплексной терапии с лейкоинтерфероном.// Вестник дерматологии и венерологии, 1994, №4 стр. 22 - 25.

5. Покровский В.И. и др. Этиология, диагностика и этиотропная терапия острых пневмоний. М. «Медицина». 1995 стр. 226 -265.

6. Прозоровский С.В. и др. // Медицинская микоплазмология», М., «Медицина», 1995.-225 с.

7. Раковская И.В., Вульфович Ю.В. // «Микоплазменные инфекции урогенитального тракта», Ассоциация САНАМ, М., 1995.- 66 с.

8. Соловьев С.В. и др. Выявление тетрациклин- и эритромициноустойчивых штаммов урогенитальных микоплазм с помощью ПЦР. ЖМЭИ, 1998. №6, стр. 3-7.

9. Цинзерлинг А.В., Вуду Г.А. «Внутриутробный микоплазмоз».- Кишинев. (Штиинца).- 1986.- 189с.

10. Baseman J.B., Tully J.G. Mycoplasmas: Sophisticated, Reemerging and Burdened by their Notoriety // Emerging Infect. Dis. 1997, vol.3., №1, p.21 - 32

11. Methods of Mycoplasmaology. Ed. T.G. Tully, Sh. Rasin. Academic Press.- 1983.- p. 439.

12. Борисенко К.К., Беднова В.Н., Делекторский В.В. и др. Основные итоги работы и перспективы исследований в ЦКВИ в области венерологии. Вестн. дерматол. 1991;7:55-8.

УЧЕБНО-МЕТЕРИАЛЬНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ

1.Наглядные пособия:

Слайды
Таблицы
Цветные атласы
Фотографии.

2.Технические средства обучения:

Тестовый контроль оценки исходного и итогового уровня знаний слушателей
Ситуационные задачи

3.Приложения:

Методические рекомендации

-

Введение

Заболевания человека, вызываемые микоплазмами, объединяют в группу микоплазмозов человека. Возбудители этой группы инфекций - микоплазмы являются самыми мелкими свободно живущими прокариотами. Они привлекают большое внимание исследователей по двум причинам:

1) из-за своей уникальной организации

2) благодаря тому, что очень часто контаминируют культуры клеток, вызывают заболевания растений, животных и человека, оказывают влияние на размножение ряда вирусов, и в том числе онкогенных и ВИЧ, а также сами способны вызывать иммунодефицитное состояние.

По современной классификации микоплазмы относятся к классу Mollicutes отдела Tenericutes царства Procariotae. Класс Mollicutes имеет 3 порядка: Acholeplasmatales; Mycoplasmatales, Anaeroplasmatales. 1-й порядок включает одно семейство Acholeplasmataceae с одним родом Acholeplasma, 2-ой порядок состоит из двух семей Spiroplasmataceae с одним родом Spiroplasma и Mycoplasmataceae с двумя родами Mycoplasma и Ureaplasma. Недавно выделенный 3-й порядок включает семейство Anaeroplasmataceae с двумя родами Anaeroplasma и Asteroplasma.

Термином “микоплазмы” как правило, обозначают все микроорганизмы семейств Mycoplasmataceae и Acholeplasmataceae.

Биология микоплазм

Отличительными особенностями микоплазм, уникальными для прокариот являются:

1. Отсутствие ригидной клеточной стенки и ее предшественников, обуславливает ряд биологических свойств микоплазм: полиморфизм их клеток пластичность, осмотическую чувствительность, способность проходить через поры с диаметром 0,22 мкм, резистентность к различным агентам, подавляющим синтез клеточной стенки, и в том числе к пенициллину, его производным и синтетическим пенициллинам. Все микоплазмы грамотрицательны.

Полиморфизм микоплазм проявляется в том, что все колонии состоят разнообразных элементов: палочек, коккоподобных клеток, шаров различной оптической плотности, нитей разной длины (отсюда и название «микоплазмы»). Способы репродукции этих разнообразных структур множественны: почкование, сегментация ветвистых и цепочечных форм, бинарное деление, распад нитей на отдельные кокковидные элементы. Микоплазмы не образуют спор.

2. Малый размер генома - 500 - 1000 МД, наименьший для прокариот (1/16 генома *E. coli*. 1/10 генома риккетсий). Простота организации, размер генома определяют ограниченность биосинтетических возможностей микоплазм и, следовательно, их высокие требования к условиям культивирования.

3. Минимальное количество органелл - 3-х слойная цитоплазматическая мембрана, прокариотический нуклеоид и рибосомы.

4. Низкое соотношение Г+Ц пар в ДНК, у большинства видов 25 - 30%. Исключением является *M. pneumoniae*, у которой Г+Ц пары составляют 39 - 40%. Теоретический минимум содержания Г+Ц, необходимого для кодирования белков с нормальным аминокислотным набором равен 26%, поэтому многие эволюционисты полагают, что микоплазмы находятся на грани жизни.

5. Способность паразитировать на мембране клеток эукариот - очень важное свойство, отличающее микоплазмы от хламидий (последние, как известно, являются внутриклеточными паразитами). Микоплазмы - мембранные паразиты. Они могут быть обнаружены внутри лишь тех клеток, которые способны к фагоцитозу, за исключением, по-видимому, *M. penetrans* и некоторых штаммов *M. fermentans*, активно проникающих в клетки. Способность микоплазм паразитировать на мембране эукариотической клетки во многом определяет патогенез вызываемых ими инфекций.

6. Способность расти на различных питательных средах и образовывать на поверхности агара колонии диаметром 0,1 - 0,3 мм (микоплазмы) и 0,01 - 0,03 мм (уреаплазмы) с выпуклым, врастающим в агар центром и нежной, часто ажурной периферией. Типичные колонии похожи на яичницу-глазунью (fried egg).

7. Рост микоплазм в среде подавляется специфическими иммунными сыворотками, что выявляется в реакции нейтрализации или ингибиции роста, либо в реакции ингибиции метаболизма.

Мембраны микоплазм похожи на мембраны клеток эукариот, они асимметричны, внешний слой имеет большую толщину, чем внутренний.

Микоплазменная мембрана - это подвижная система, состоящая из 2-х белковых слоев (внешнего и внутреннего), погруженных во внутренний липидный слой. Внешний слой мембраны более текучий, чем внутренний. Белки в мембране составляют около 40%. Периферические белки легко вымываются из мембраны при изменении рН и ионной силы раствора, тогда как интегральные гидрофобные белки можно выделить только при обработке детергентами. Мембраны включают углеводсодержащие соединения: гликопротеиды, полисахариды и липополисахариды. На долю липидов приходится около 40 %, из них 60% - нейтральные липиды. Главный компонент последних - холестерин. Он является необходимой составляющей среды культивирования

Отсутствие ряда ферментных систем должно было бы поставить микоплазмы в чрезвычайно невыгодное положение при конкуренции с другими микроорганизмами. Однако следует иметь в виду, что клетки микоплазм очень тесно связаны с клетками хозяина, и отсутствие некоторых ферментных систем компенсируется наличием ферментов и механизмов, с помощью которых микоплазмы извлекают необходимые вещества из клеток высших организмов.

Существуют две основные **теории происхождения микоплазм**. Согласно одной из них, микоплазмы - прямые потомки первичных организмов, обособившихся до того как разделились про- и эукариоты и раньше, чем произошло образование пептидогликановой клеточной стенки бактерий. По второй - микоплазмы произошли от бактерий, а примитивизм их организации является следствием паразитизма. Вторая теория в свою очередь предполагает два варианта. Первый - микоплазмы произошли от единого бактериального предка, общего с Грам-положительными бактериями; второй - микоплазмы представляют собой сборную группу потомков разных бактерий.

Основой современных представлений о филогении прокариот являются данные о первичной структуре рибосомной РНК, в частности 16S и 5S РНК, которые в эволюции являются наиболее консервативными биологическими макромолекулами. На основании такого анализа предполагается, что предки микоплазм отделились от кластридиальной ветви Грам-положительных бактерий, уже обладавших низким уровнем Г+Ц пар в ДНК. Высказывается предположение, что в процессе происхождения микоплазм от Грам-положительных бактерий главная роль принадлежала L-трансформации, т.е. L-форы являлись первичной и основной ступенью в дальнейшей эволюции микоплазм.

В настоящее время известно более 100 видов микоплазм (число обнаруживаемых видов постоянно растет). Микоплазмы выделяют из растений, от моллюсков, насекомых рыб, птиц и млекопитающих. Человек является естественным хозяином по крайней мере 14 видов микоплазм: *M. buccale*, *M. faucium*, *M. fermentans*, *M. genitalium*, *M. lipophilum*, *M. orale*, *M. hominis*, *M. salivarium*, *M. penetrans*, *M. pirum*, *M. pneumoniae*, *M. spermatophilum*, *U. urealyticum*, *Acholeplasma laidlawii*. Биологические свойства этих видов микоплазм приведены в таблице 1. Реже от человека выделяют *M. primate* и другие виды, естественными хозяевами которых принято считать различных животных.

Проникновение и взаимодействие с клеткой. Микоплазмы проникают в организм воздушно-капельным или контактными путями, в том числе половым, преодолевают слизистый слой, покрывающий эпителий и достигают клеток эпителиальных тканей, вероятно, с помощью хемотаксиса.

Некоторые виды микоплазм обладают микроворсинками и специальными терминальными структурами, содержащими актиноподобный белок, с помощью которых микоплазмы активно двигаются и прикрепляются к клеткам инфицированного организма. Микоплазмы могут адсорбироваться практически на любых клетках эукариот, размножаться на их поверхности и в межклеточных пространствах в непосредственной близости от клеточных мембран. Контакт между мембранами микоплазм и мембранами клеток хозяина настолько тесный, что есть основания говорить в некоторых случаях о слиянии контактирующих мембран. Способность к такому слиянию рассматривается как один из факторов патогенности микоплазм. Процесс прикрепления микоплазм к клеткам хозяина состоит, по-видимому, из двух фаз. Первая - фаза неспецифического взаимодействия - осуществляется в результате броуновского движения микоплазм и случайных столкновений с клетками хозяина. Следующая фаза - лиганд-рецепторное взаимодействие - достаточно подробно изучена у некоторых видов микоплазм. Известно, что главным адгезином *M. pneumoniae* является белок P1 с молекулярной массой 160 kD, хотя и другие белки с меньшей молекулярной массой также принимают участие в связывании. Некоторые виды микоплазм взаимодействуют с клеткой хозяина по типу липид-липидного прилипания, при этом показана возможность обмена отдельными фрагментами контактирующих мембран. Установлено также, что в адгезии микоплазм участвуют гидрофобные связи. Природа рецепторов в

мембране клеток-мишеней хозяина также активно исследуется. Так, показано, что в мембране эритроцитов это сиалогликопротеины. Связывание микоплазм с рецепторами гликопротеиновой природы может привести к нарушению нормальных физиологических функций этих рецепторов, клеточных контактов, клеточной кооперации и взаимодействия между клетками в процессе роста, изменению архитектоники мембран и ионного транспорта через мембрану.

В результате взаимодействия микоплазм и клеток может происходить **изменение антигенного профиля взаимодействующих мембран** и, как следствие, **индукция различных аутоиммунных реакций**. Адсорбция микоплазм на лимфоцитах может привести к неспецифической поликлональной активации Т- и В-клеток и к последующему развитию аутоиммунных реакций, либо к подавлению пролиферации лимфоцитов и, следовательно, иммуносупрессивному эффекту.

Прочное связывание микоплазм с клеткой обеспечивает их устойчивость к механическому движению ресничек клеток мерцательного эпителия, а преимущественное расположение адсорбированных микоплазм в инвагинатах клетки-хозяина защищает от действия антител, что способствует их длительной персистенции.

По всей видимости, не существует какой-либо другой группы прокариот, сведения о патогенетической роли которых были бы столь разноречивы и запутаны. Большинство видов микоплазм человека являются, по-видимому, комменсалами здоровых людей. Другие виды (*M. pneumoniae*, *M. hominis*, *U. urealyticum*, *M. fermentans*, , *M. penetrans*,) обладают потенциальной патогенностью.

В силу эволюционной продвинутой микоплазмы, вероятно, нужно рассматривать как следующую генерацию бактериальных патогенов, и для правильного и полного понимания их потенциальной патогенетической роли необходимо разработать новые подходы.

Чувствительность к антибиотикам. Ввиду отсутствия клеточной стенки микоплазмы устойчивы ко всем препаратам, действие которых связано с биосинтетическими процессами белков клеточной стенки и чувствительны к ингибиторам синтеза мембранных и внутрицитоплазматических белков. Они чувствительны к антибиотикам тетрациклинового ряда, макролидам, линкозаминам, аминогликозидам и хинолонам. Данные о чувствительности трех видов микоплазм к антибиотикам *in vitro* приведены в табл. 2 .

Все три вида микоплазм высоко чувствительны к тетрациклам, наиболее эффективны доксицилин, вибромицин и миноциклин. Все микоплазмы чувствительны к новейшим хинолонам.

Таблица 2.

Относительная чувствительность *in vitro* *M. hominis*, *U. urealyticum* и *M. pneumoniae* к антибиотикам, ингибирующим рост микоплазм (составлено по сводным данным)

Антибиотики, мкг/мл	M. hominis	U. urealyticum	M. pneumoniae
Тетрациклин	0,05 - 0,2	0,05 - 6,0	0,006 - 0,8
Окситетрациклин	1,6-4	6,5-62	0,3-6,3
Хлортетрацикин	1-1,2	-	1,6-6,3
Метациклин	0,2-8	-	0,4-3,1
Доксициклин	0,1-0,4	0,01-0,5	0,2
Миноциклин	0,2-0,8	0,5-62	-
Макролиды, линкозаминны, стрептограммины			
Эритромицин	461	0,4-3	0,01
Олеандомицин	512	5,9	0,05
Спиромицин	46,9	41,9	0,33
Джозамицин	0,1	0,45	0,02
Розарамицин	0,05	0,04	0,01
Линкомицин	0,65	73	4,9
Мидекамицин	0,6	0,6	0,02
Пристинамицин	0,1-0,5	0,1-1,0	0,03 - 0,05
Виргиномицин	0,8	1,3	0,15
Клиндамицин	0,03	2,62	1,5
Хлорамфеникол (левомицетин)	0,2-1,6	0,5-6,2	0,8 - 6,4
Аминогликозиды			
Стрептомицин	0,4 - 5,0	0,4 - 12,5	1,1-1,2
Канамицин	1,6-12,5	1,6-50	3,1-12,5
Гентамицин	0,8-12,5	0,4-6,2	0,4-0,8
Хинолоны			
Ципрофлоксацин	1,0	0,5-16	-
Спарфлоксацин	0,02 - 0,03	-	-
Грипафлоксацин	0,05	0,1 -2	-
ВАУ 12- 8039	0,05	0,05-0,5	-

Особенности микоплазменных инфекций

Инфекции, вызываемые микоплазмами, имеют следующие характерные черты:

1. По клинико-морфологическим признакам микоплазменные инфекции сходны с заболеваниями, вызываемыми другими микроорганизмами:

хламидиями, вирусами, грибами, а также химическими веществами, т.е. сходны с другими полиэтиологическими заболеваниями; они не имеют собственных клинических проявлений, что весьма осложняет диагностику и свидетельствует о необходимости применения методов лабораторной диагностики и получения эпидемиологических данных.

2. Микоплазменные инфекции могут протекать остро, но чаще имеют хроническое рецидивирующее течение

3. Развитие микоплазмозов в значительной степени определяется чувствительностью хозяина к инфекции. Данные о генетическом детерминировании чувствительности к микоплазмам получены при моделировании инфекции на конгенных мышах. Логично предположить, что человеческая популяция также неоднородна по этому признаку. На эту тему уже появились первые публикации.

4. Характер патологического процесса зависит от входных ворот инфекции. Так, *M. hominis* может вызывать у человека фарингит и заболевания урогенитального тракта. В литературе описано несколько случаев пневмонии, вызванной *M. hominis*. При внутриутробном микоплазмозе плода инфекция развивается в верхних дыхательных путях, легких, урогенитальном тракте, ЦНС.

5. Микоплазменные инфекции часто сопровождаются различными иммунопатологическими реакциями, которые осложняют и во многом определяют течение инфекции. Больные с дефектами иммунной системы особенно чувствительны к микоплазменным инфекциям. Иммуносупрессивная химиотерапия при трансплантации органов и тканей или при опухолевых процессах увеличивает риск инфекций, связанных с микоплазмами - представителями нормальной микрофлоры человека, а также теми, которые приобретаются при контактах с инфицированными животными.

6. Микоплазмы могут вызывать локальную инфекцию и не проникать в подлежащие ткани. Однако, тканевый тропизм легко преодолевается, часто наблюдается диссеминация возбудителя в тканях и органах, что приводит к генерализации процесса.

7. Для микоплазменных инфекций характерна длительная персистенция возбудителя в инфицированном организме. Одной из причин является широкая вариабельность мембранных белков, которая в значительной степени связана с наличием в геноме их множественных генных копий и с возможностью гомологичных рекомбинаций между ними. Благодаря этому увеличивается кодирующая способность их маленького генома, генетическое разнообразие микоплазм и, следовательно, их способность ускользать от иммунного надзора хозяина. Другие причины длительной персистенции микоплазм в инфицированном организме суммированы в табл.3.

Механизмы длительной персистенции микоплазм

I. Механизмы ускользания от защитных систем хозяина:

1. Отсутствие фагоцитоза или незавершенный фагоцитоз.

а) наличие полисахаридной капсулы;

- б) отсутствие клеточной стенки с набором сильных антигенов;
- в) малый размер клеток;
- г) наличие в мембране микоплазм антигенов, перекрестно реагирующих с тканями хозяина.

2. Способность прочно связываться с мембраной инфицированной клетки - биологическая мимикрия.

3. Сходство структуры и биохимического состава мембран микоплазм с мембранами клеток эукариот,

4. Наличие в мембране микоплазм антигенов, перекрестно реагирующих с тканями хозяина.

5. Вариабельность мембранных белков

II. Механизмы активного воздействия микоплазм на защитные системы хозяина:

1. ЦПД на макрофаги Нарушение клеточной кооперации в индукции иммунного ответа

2. ЦТД на макрофаги

3. Суперантигенные свойства =====> Глубокие нарушения иммунного ответа

4. Стимуляция Т-супрессоров =====> Нарушение индукции иммунного ответа

5. Неспецифическая стимуляция лимфоцитов =====> Срыв толерантности к собственным антигенам

6. Наличие протеаз, расщепляющих IgA.

8. Микоплазменные инфекции являются ко-факторами различных заболеваний: СПИДа, опухолевых процессов, артритов, а также некоторых комплексных синдромов неясной этиологии: синдрома хронической усталости, болезни Крона и др.

инфекций верхних дыхательных путей (фарингита, трахеобронхита), либо по типу **пневмоний**. В первом случае заболевание сравнительно легкое, чаще субклиническое. Проявляется как назофарингит, трахеит, бронхит. Инкубационный период чаще 3- 11 дней, хотя в ряде случаев более длительный (до 3-х нед.). Температура тела 37,1-37,5°C, реже 38°C. Кашель малопродуктивный. Чаще инфекция благополучно разрешается, но может распространиться на территорию легких. Микоплазменная пневмония может развиваться постепенно, либо иметь острое начало. Ведущий клинический симптом - длительный изнуряющий кашель. При аускультации ослабленное дыхание, минимальное количество влажных хрипов. На рентгенограммах шоку.

Урогенитальные микоплазмы

1. M. hominis. Биология.

Геном M. hominis представляет собой кольцевую двуспиральную ДНК размером 450 mD.

M. hominis серологически гетерогенна. Для разных серотипов характерна высокая гомология их ДНК (52 - 100%). Мембранные белки характеризуются вариабельностью.

M. hominis неподвижна и обладает следующими биохимическими свойствами:

разлагает аргинин, не разлагает глюкозу, слабо разрушает метиленовый синий, не имеет фосфатазной, липазной и уреазной активности, не вызывает редукции тетразола, гемолиза и гемагглютинации эритроцитов, колонии не адсорбируют эритроциты.

Таким образом, основным источником энергии для *M. hominis* является аргинин, разлагаемый этой микоплазмой путем 3-ступенчатого гидролиза аргининдеаминой. Выделение аммиака в процессе роста приводит к защелачиванию среды культивирования, что регистрируется по изменению окраски индикатора.

M. hominis способна адсорбироваться на различных прокариотических и эукариотических клетках, таких как: *Neisseria gonorrhoeae*, клетках человека и животных в условиях *in vitro*, а также на сперматозоидах человека.

M. hominis часто контаминирует перевиваемые клетки различного происхождения. Как правило, эта инфекция не сопровождается ЦПД и может быть выявлена лишь специальными методами. При отсутствии ЦПД *M. hominis* способна вызывать в клетках хромосомные aberrации.

В связывании *M. hominis* с эукариотической клеткой принимают участие белки P100 и P50. Белок P1 в мембране не обнаружен.

Клетки *M. hominis* обладают протеолитической и фосфолипазной активностями. Предполагается, что фосфолипаза гидролизует фосфолипиды клеток плаценты, что приводит к увеличению в них количества арахидоновой кислоты, активирующей синтез простагландинов, что, в свою очередь, может явиться причиной спонтанных аборт, преждевременных родов, гибели плода. В присутствии *M. hominis* изменяется включение тимидина и уридина в структуру ядра. Как и другие виды микоплазм, *M. hominis* обладает эндо- и экзонуклеазами и воздействует на нуклеиновый обмен инфицированных ею клеток.

2. *U. urealyticum* . Биология.

Впервые *U. urealyticum* была выделена от больного негонококковым уретритом в 1954 г. Первоначально уреоплазмы были названы «Т-штаммами микоплазм» (Tiny -мельчайшие), что объяснялось их более мелкими, чем у микоплазм, размерами колоний. Позже выяснилось, что при оптимизации условий культивирования величина колоний уреоплазм возрастает и приближается к размерам колоний микоплазм.

Наиболее характерным биологическим свойством, отличающим уреоплазмы от остальных представителей класса Mollicutes, является их способность гидролизовать мочевину до аммиака, т.е. наличие уреазной активности.

Для уреоплазм характерен относительно быстрый рост. Кривая роста уреоплазм имеет сходство с кривой роста микоплазм в области латентной и ранней логарифмической фаз, однако логарифмическая фаза роста у них значительно сокращена и уже через 16 - 18 часов переходит в стационарную, тогда как у микоплазм эта фаза составляет 78 и более часов. Оптимум рН

ростовой среды несколько ниже, чем у большинства микоплазм - в пределах 6,0 - 6,5; тогда как у микоплазм 7,0 - 7,6. При выделении уреоплазм из клинического материала пробы инкубируют до 3 суток и более, т.к. в этом случае латентная фаза может затянуться. Титр КОЕ в жидкой питательной среде у уреоплазм ниже, чем у микоплазм - **не более чем 10^6 - 10^7 КОЕ/мл.**

На плотной среде уреоплазмы более успешно культивируются в атмосфере газовых смесей, содержащих 5% CO₂ и 95% N₂, либо 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂. Среда культивирования должна содержать мочевины. Ацетат таллия в среду добавлять нельзя, т.к. он ингибирует рост уреоплазм. О росте судят по интенсивности защелачивания среды, т.е. по изменению окраски индикатора, поэтому титр уреоплазм принято обозначать в цветообразующих единицах (ЦОЕ).

Клетки уреоплазм синтезируют экстрамембранный капсулоподобный компонент, содержащий углеводы.

Уникальной для Mollicutes способностью уреоплазм является наличие протеазной активности, направленной на IgA человека. В настоящее время известно 14 серотипов уреоплазм, которые разделяются на 2 биовара: биовар Parvo включает 4 серотипа (1, 3, 6, 14), биовар T-960 - остальные 10 серотипов. В последние годы активно исследуется роль различных серотипов в возникновении инфекции. Получены данные о преимущественной причастности представителей биовара T-960 к развитию хронических патологических состояний, хотя их нельзя считать окончательно доказанными. От одного человека могут быть выделены одновременно уреоплазмы различных серотипов.

Уреоплазмы выделяют не только от человека. Они обнаружены также у обезьян, крупного рогатого скота, коз, овец, собак, кошек, хомяков, мышей, птиц. Большинство уреоплазм животных относится к виду *U. diversum*, а уреоплазмы птиц выделены в отдельный вид *U. gallorale*.

U. urealyticum способна прикрепляться к различным клеткам: эпителиальным клеткам уретры, сперматозоидам и перевиваемым клеткам различных линий, Механизмы связывания с клетками сходны с теми, которые установлены для других патогенных видов микоплазм, в частности, *M. pneumoniae*.

3. M. genitalium. Биология.

M. genitalium была впервые выделена в 1981 г. из уретры двух мужчин, страдающих негонококковым уретритом. Клетки этой микоплазмы обладают терминальной, похожей на тыкву органеллой. С помощью этой структуры клетки микоплазмы связываются с эритроцитами и другими клетками эукариот. *M. genitalium* прикрепляется к стеклу и пластику. Она разлагает глюкозу и не разлагает аргинин и мочевины. Для роста нуждается в холестерине, растет при температуре 30 - 37°C, чувствительна к ацетату таллия.

Серологически эта микоплазма отличается от других видов микоплазм, но содержит мембранный антиген Pa, имеющий общие эпитопы с PI *M. pneumoniae*. Его молекулярная масса 140 kD, он локализован на поверхности

терминальной структуры и является главным адгезином и иммуногеном *M.genitalium*.

С помощью ПЦР *M.genitalium* была обнаружена не только в урогенитальном тракте, но и в горловых смывах. Ввиду наличия общих с *M. pneumoniae* антиген одинаковых биохимических свойств исследование роли *M.genitalium* в патологии респираторного тракта затруднено. Для диагностических целей недавно предложена питательная селективная среда, содержащая стрептомицин, к которому *M.genitalium* в отличие от *M. pneumoniae*, нечувствительна.

4. M. fermentans. Биология.

Эта микоплазма была впервые выделена из нижних отделов урогенитального тракта взрослых мужчин и женщин в начале 1950 г.г., тем не менее ее роль в заболеваниях УГТ окончательно не выяснена. В 1970 г.г. *M. fermentans* была обнаружена в синовиальной жидкости при РА и воспалительных заболеваниях суставов человека, а также в костном мозге детей, больных лейкемией. В 1990 г.г. была выделена и позже детально изучена *M. incognitus*, оказавшаяся одним из штаммов *M. fermentans*.

M. fermentans ферментирует глюкозу и аргинин и обладает уникальными биологическими особенностями. Она адсорбирует IgG человека, в результате чего к агрегированному иммуноглобулину образуются аутоантитела (анти-IgG), т.е. ревматоидный фактор, который затем может присоединять компоненты комплемента и IgM. Иммуные комплексы циркулируют, фиксируются в тканях и индуцируют иммунопатологические реакции.

M. fermentans штамм *incognitus* отличается от известных ранее микоплазм способностью размножаться не только на мембранах инфицированных клеток, но и внутриклеточно.

M. fermentans способна сливаться с лимфоцитами человека, индуцировать синтез интерлейкинов (ФНО, ИЛ-6), увеличивать экспрессию Fas-рецепторов, т.е. активировать лимфоциты.

Эпидемиология. Все перечисленные микоплазмы передаются контактно бытовым, в т.ч. половым путем, при этом последний наиболее распространен, поэтому микоплазменные инфекции часто относят к ЗППП. Возможен и вертикальный путь передачи, который может осуществляться в результате восходящей инфекции из влагалища и цервикального канала. При наличии инфекции в околоплодных водах плод инфицируется через пищеварительный тракт, кожу, глаза, УГТ. Микоплазмы проникают через плодные оболочки быстрее и легче, чем бактерии и обсеменяют плод, обладающий повышенной восприимчивостью к инфекции из-за отсутствия нормальной микрофлоры. Микоплазмы могут инфицировать плаценту, в которой развивается децидуит, и в этом случае может произойти инфицирование плода гематогенным путем через пупочный канатик. Возможно инфицирование плода во время родов при прохождении через инфицированные родовые пути. Дети, родившиеся через кесарево сечение, инфицированы реже. У новорожденных микоплазмы чаще всего колонизируют носоглотку и влагалище. В течение 1-го года жизни число детей, инфицированных микоплазмой, постепенно уменьшается, но по

некоторым данным, у 5% годовалых девочек, ранее инфицированных, еще удается выделить микоплазму. После достижения половой зрелости и увеличения частоты половых контактов инфицированность микоплазмами резко возрастает. Так, показано, что у студентов-девственников микоплазмы отсутствуют, тогда как 14% лиц, имеющих 3 половых партнеров или более, оказываются инфицированными. Наибольшая обсемененность отмечена среди лиц 30 -40 лет. В возрасте старше 45 лет она постепенно уменьшается. Частота инфицированности *M. hominis* и *U. urealyticum* коррелирует с частотой половых контактов. Наиболее часто их обнаруживают у лиц, связанных групповым сексом, гомосексуалистов, проституток, перенесших гонорею и другие ЗППП. Показано, что после прекращения половых контактов эти микроорганизмы длительно персистируют в УГТ, впрочем иногда возможно их спонтанное исчезновение,

Многочисленные исследования свидетельствуют о наличии определенной зависимости между инфицированностью микоплазмами и социально-экономическими условиями жизни. Чернокожие чаще инфицированы, чем люди белой расы. У мужчин микоплазмы наиболее часто колонизируют уретру и крайнюю плоть, у женщин - влагалище, реже цервикальный канал и уретру. Микоплазмы могут быть выделены из мочи. Барьерные методы контрацепции и некоторые химические контрацептивы предохраняют от инфекции.

Антитела к микоплазмам часто обнаруживают у новорожденных при преждевременных родах, но, как правило, это материнские антитела, хотя в некоторых работах при обследовании новорожденных с низкой массой тела (< 2500 г) IgM обнаруживали в 90% случаев (30/40) в день рождения, при этом культуры были положительными в 17,5% (7/40), ПЦР была положительной в 37,5% (P.Quinn et al., 1998), что свидетельствовало о наличии внутриутробной инфекции.

Данные о частоте распространения микоплазм среди населения разноречивы. Показатели инфицированности по данным разных авторов варьируют от 10 до 50% , по некоторым данным очень высока инфицированность беременных женщин (до 80%). При этом чаще беременность протекает благополучно и отклонений в средней величине массы тела у новорожденных не наблюдается.

Патогенность. Микоплазмы очень часто выявляются у клинически здоровых людей. Поэтому несколько лет назад вопрос о причастности микоплазм к тому или иному заболеванию решался положительно, если одновременно соблюдались условия:

- 1) Более частое выделение от больных, чем от здоровых;
- 2) Нарастание титра антител в динамике заболевания;
- 3) Воспроизведение процесса на добровольцах лабораторных животных.

Однако стало известно, что гуморальные антитела в ряде случаев не образуются из-за слабых иммуногенных свойств возбудителя, не являются протективными и отражают лишь массивность инвазии. В настоящее время главное внимание уделяется именно массивности инвазии. Принято считать, что микоплазмы причастны к развитию воспалительного процесса, если их титр в исследуемых про $>10^4$

КОЕ, в других случаях присутствие микоплазм рассматривается как здоровое носительство.

Почему же в УТТ в ряде случаев происходит активное размножение микоплазм, и их титр достигает пороговой величины 10^4 КОЕ/мл и выше? Оптимальное значение рН для размножения микоплазм 6,5 - 8. Во влагалище в норме рН составляет 3,8 – 4,4. Кислую реакцию поддерживает молочная кислота, образуемая лактобациллами гликогена клеток слизистой генитального тракта. В норме 90 - 95% микроорганизмов составляют лактобациллы, на долю других приходится соответственно 5 – 10% (дифтероиды, стрептококки, стафилококки, кишечная палочка, гарднерелла). В результате различных неблагоприятных воздействий: применения антибиотиков гормонотерапии, радиоактивного облучения, ухудшения условий жизни и развития иммунодефицита, а также психических стрессов возникает состояние дисбиоза, в УТТ возрастает количество условно-патогенной микрофлоры. *G.vaginalis* образует янтарную кислоту, которая используется другими условно-патогенными микроорганизмами. Их рост сопровождается изменением рН от 3,8 - 4,4 до 6,8 - 8,5. Создаются благоприятные условия для колонизации генитального тракта микоплазмами, и происходит их активное размножение. Таким образом, **микоплазмы**, особенно при обнаружении их в высоком титре, можно рассматривать **в качестве индикаторов патологии определенной экосистемы**. Какова же в этой экосистеме роль микоплазм? Ответить на этот вопрос достаточно сложно, т.к. микоплазмы чрезвычайно широко распространены среди клинически здоровых лиц. Тем не менее, существуют патологические состояния, при которых этиологическая роль микоплазм доказана. К ним относятся негонококковый уретрит, эпидидимит (возбудители *U. urealyticum* и *M.genitalium*) , воспалительные заболевания органов малого таза, спонтанные аборт, мертворождение, рождение детей с низкой массой тела, с хроническими заболеваниями легких, пороками развития, преждевременный разрыв плодных мембран, послеродовый и послеабортный сепсис, некоторые случаи бесплодия. Описаны случаи перитонита, развившегося после пересадки инфицированной микоплазмами почки, случаи септического артрита и артрита у людей с гипогаммаглобулинемией, случаи выделения микоплазм в качестве единственного инфекционного агента из ликвора новорожденных детей при менингите, менингоэнцефалите, абсцессах мозга.

Клинические проявления

Негонококковый уретрит и простатит.

НГУ или неспецифический уретрит - наиболее распространенное следствие уреоплазменной инфекции и инфекции, вызванной *M.genitalium*, возникающих, как правило, у мужчин. Роль уреоплазм в развитии НГУ впервые была показана в 1964 г. при широком эпидемиологическом обследовании моряков на нескольких военно-морских базах США и женщин в портовых городах. На большом материале было доказано, что уреоплазмы вызывают НГУ, для которого характерно течение с рецидивами, Инкубационный период длится 3-5 нед. Доказательства развития НГУ уреоплазменной природы были

получены при заражении добровольцев и при экспериментальном заражении обезьян.

По данным сероэпидемиологических обследований только у 10% больных с уреоплазменным уретритом выявлено 4-кратное увеличение количества специфических антител.

Развитие **простатитов** также является довольно частым проявлением уреоплазменной инфекции.

Женщины часто являются бессимптомными носителями микоплазм и уреоплазм. Такое **бессимптомное носительство** можно рассматривать как **состояние риска**. Развитие инфекционного процесса может быть спровоцировано различными факторами: сопутствующей инфекцией, изменением гормонального фона в связи с фазой естественного цикла созревания яйцеклетки, состоянием беременности и другими изменениями физиологического и иммунного статуса организма. Присутствие во влагалище небольшого количества уреоплазм и микоплазм может особенно не настораживать. Выявление уреоплазм в моче также может быть транзиторным и не иметь последствий. Однако, при проникновении уреоплазм в более глубокие отделы мочевыводящей, а также половой системы могут развиваться серьезные последствия. Например, *U. urealyticum* может явиться причиной развития острого уретрального синдрома.

Воспалительные заболевания органов малого таза.

Причиной развития воспалительных заболеваний органов малого таза - острого и хронического сальпингитов, хронического неспецифического сальпингоофорита, тубовариальных абсцессов, параметрита, эндометрита, аднексита, воспаления тазовой клетчатки и брюшины - чаще всего являются факультативные и строго анаэробные бактерии, микоплазмы и уреоплазмы. Весьма часто причиной упомянутых заболеваний является смешанная инфекция. Так, при обследовании 201 пациентки с эндометритом *M. hominis* в качестве единственного инфекционного агента была обнаружена лишь в 7% случаев, в то время как у 44% больных она была выделена вместе с уреоплазмой и (или) хламидиями. Вполне вероятно, что микоплазмам и уреоплазмам при указанных патологических процессах принадлежит вторичная патогенетическая роль. С присутствием *M. hominis* и *U. urealyticum* **связывают воспалительные процессы верхних отделов мочевыводящих путей**, что нашло свое подтверждение в экспериментах на лабораторных животных.

Имеются публикации, свидетельствующие о том, что скрытая инфекция и ее субклинические формы представляют большую потенциальную опасность, так как при некоторых условиях она может активизироваться и явиться причиной тяжелых **септических процессов**. Так, описан случай **перитонита** микоплазменной этиологии, развившийся на 6-й день после пересадки почки. Обсемененность УГТ *M. hominis* или *U. urealyticum* является серьезным **фактором риска при трансплантации почки** и при стероидной терапии.

Патология беременности и плода.

Роль микоплазм в патологии беременности и плода активно исследуется. Микоплазменное инфицирование эндометрия может привести к отслоению

плодного яйца и, таким образом, к прерыванию беременности в ранние сроки. Микоплазменная инфекция плода может развиваться и на более поздних стадиях внутриутробного развития из инфицированных околоплодных вод. *M. hominis* и *U. urealyticum* могут проникнуть в базальную пластину и вызвать развитие децидуита. Специальное морфологическое исследование тканей плацент, инфицированных *M. hominis*, проведены А. В. Цинзерлингом и Г.А. Вуду (1986). Бактериальные поражения плаценты коренным образом отличались от микоплазменного. Для первых были характерны гнойные воспаления в оболочках, субхориальном интервиллезном пространстве и стенках крупных сосудов, гнойные тромбоваскулиты с образованием гематогенных абсцессов; для второго - пролиферативные, дистрофические и некротические изменения во всех слоях органа, иногда сочетающиеся с воспалительными реакциями и поражением сосудов.

Исход беременности характеризовался частым недонашиванием, преждевременным отхождением околоплодных вод, хориоамнионитом (в родах) и метроэндометритом (в послеродовом периоде). Микоплазмы могут быть выделены из крови рожениц сразу после родов, а также через несколько дней после них. Клиническое течение послеродового сепсиса характеризуется внезапным началом без предшествующего субфебрилитета и относительно благополучным состоянием пациенток. Септическое состояние исчезает, как правило, без специального лечения.

При наличии микоплазменной и уреоплазменной инфекций у матери плод может быть инфицирован интранатально. Входными воротами инфекции наиболее часто являются слизистые глаз, ротовой полости, половых органов и дыхательных путей. Однако, самостоятельная роль микоплазм в развитии острых воспалительных процессов-

дыхательных путей у новорожденных при инфицировании их во время родов невелика и проявляется преимущественно у недоношенных детей. Недоношенные дети инфицированы микоплазмой в 3 раза чаще, чем родившиеся в срок. В случае интранатальной колонизации микоплазмами доношенных детей в постнатальном периоде происходит быстрая элиминация микоплазм.

При **внутриутробном микоплазмозе** часто развивается генерализованный патологический процесс; поражаются органы дыхания и зрения плода, печень, почки. ЦНС, кожные покровы, реже периферическая нервная система. **Внутриутробная микоплазменная пневмония** протекает, как правило, в виде интерстициальной пневмонии, сопровождающейся выраженными циркуляторными расстройствами, кровоизлияниями в альвеолы, образованием тромбов и гиалиновых мембран.

По данным некоторых исследователей, средняя масса тела новорожденных, инфицированных уреоплазмой, на 500 г ниже, чем неинфицированных. При этом у детей с низкой массой тела часто развиваются хронические заболевания легких (бронхолегочная дисплазия). Смертность таких детей в 2 раза выше, чем неинфицированных. От погибших детей *U. urealyticum* может быть выделена не только из легких, трахеи, плевральной

жидкости, но и из крови и спинномозговой жидкости, что указывает на развитие генерализованной инфекции.

Бесплодие.

В литературе активно обсуждается вопрос о влиянии микоплазм на репродуктивную функцию человека. Бесплодие у мужчин, вызванное уреоплазмами, может быть обусловлено не только воспалительными процессами, но и непосредственным влиянием уреоплазм на сперматозоиды, их жизнеспособность и подвижность. С помощью сканирующей электронной микроскопии показано, что в месте контакта уреоплазмы и сперматозоида происходит слияние и лизис мембраны, что в свою очередь может приводить к потере жизнеспособности и подвижности. Показано также наличие общих антигенов в мембране сперматозоида и *U. urealyticum*, что часто приводит к образованию антител, повреждающих мембрану сперматозоида.

При исследовании влияния *U. urealyticum* на сперматозоиды барана *in vitro* обнаружено увеличение активности ДНКазы и разрушение ДНК сперматозоидов, что может привести к инфертильности или оказать отрицательное влияние на эмбриональное развитие.

У инфицированных *M. hominis* женщин вторичное бесплодие может развиваться в результате воспалительных процессов, как приводящих к нарушению оогенеза, так и препятствующих продвижению яйцеклетки.

Показано, что при длительной персистенции в организме *M. hominis* и *U. urealyticum* оказывают влияние на хромосомный аппарат половых и соматических клеток; вызывают различные хромосомные aberrации, разрывы и фрагментацию хромосом, появление новых, несвойственных данному кариотипу вариантов хромосом, полиплоидию, а также подавляют митоз. Воздействие на хромосомы лежит в основе тератогенного и мутагенного воздействия микоплазм на плод человека. Угнетение митотической активности приводит к подавлению процесса эпителизации и тем самым к хронизации патологического процесса.

Лечение. Вопрос о необходимости лечения должен решаться в каждом конкретном случае индивидуально и положительно при наличии выраженных клинических проявлений инфекции и выделении микоплазм из половых органов в титре 10^4 КОЕ и выше. Лечение бесспорно подлежат женщины с неблагоприятным акушерским анамнезом, а также женщины детородного возраста вне беременности. Курс лечения должны пройти лица, страдающие бесплодием неясной этиологии, инфицированные микоплазмами. Лечение должно быть комплексным и включать препараты, воздействующие на возбудитель и ^средства, стимулирующие неспецифический иммунитет. В связи с тем, что микоплазмы чаще всего обнаруживают в ассоциации с другими патогенными или условно-патогенными микроорганизмами (часто с хламидиями), для лечения пациентов следует применять антибиотики широкого спектра действия. Препаратами первого выбора являются тетрациклины. В связи с тем, что более 10% штаммов микоплазм и уреоплазм устойчивы к тетрациклину, его можно заменить эритромицином, но при этом

следует помнить, что *M. hominis*, в отличие от *U. urealyticum*, к эритромицину устойчива.

В клинической практике используются следующие схемы лечения:

Тетрациклин - 500 мг каждые 6 ч - 7 дней

Доксициклин - 100 мг перорально каждые 12 ч. Первая доза - 300 мг.

Курс - 1 г.

Метациклин - первая доза 600 мг перорально, затем по 300 мг 3 раза в сутки - 9 дней или по 300 мг 4 раза в сутки.

Миноциклин - первая доза 0,2 г перорально, затем по 0,1 г 2 раза в сутки - 7-10 дней.

Мидекамицин - 0,4 г перорально 3 раза в сутки - 7 - 10 дней.

Эритромицин - 500 мг перорально 4 раза в сутки - 14 дней..

Азитромицин - 250 мг перорально 1 раз в сутки - 6 дней

Кларитромицин (клацид) - 250 мг перорально 2 раза в сутки - 10 дней

Джозамицин - 500 мг перорально 2 раза в сутки - 14 дней

Эрициклин - 500 мг перорально 4 раза в сутки - 14 дней

Рокситромицин - 0,15 г перорально 2 раза в сутки - 10 дней

Ципрофлоксацин - 500 мг перорально 2 раза в сутки - 12 - 14 дней или 750 мг 2 раза в сутки - 7 дней

Офлоксацин - 200 - 400 мг перорально 3 раза в сутки - 10 - 14 дней

Гентамицин - парентерально по 40 мг каждые 8 ч - 5 дней. Всего 600 мг.

Для санации беременных женщин на сроках 12 нед. и позже предлагается назначать эритромицин перорально по 0,2 г 4 раза в сутки 7-10 дней или по 0,5 г 2 раза в сутки в течение 10 дней.

При уретритах, простатитах и вагинитах уреоплазменной этиологии специфическая терапия должна проводиться одновременно обоим супругам.

Проблема профилактики внутриутробного микоплазмоза заслуживает особого внимания. Необходимо направленное обследование беременных женщин на разных сроках беременности. В случае выявления у них урогенитального микоплазмоза можно предупредить развитие внутриутробного микоплазмоза путем санации беременной и ее супруга. Введение таким женщинам интравагинально тетрациклина и одновременное назначение их мужьям перорально тетрациклина или назначение обоим супругам эритромицина *per os* приводило к уменьшению процента недонашивания беременности и осложнений при родах, а также снижению перинатальной смертности.

При хронической форме течения урогенитальных микоплазмозов хорошие результаты дает проведение курса антибиотикотерапии на фоне введения иммуномодуляторов.

Для неспецифической терапии рекомендуют прием адаптогенов (по обычным схемам) и эубиотиков - бифидумбактерин или ацилакт в свечах для ректального и вагинального применения.

Имеются данные о положительном эффекте в результате введения иммуноглобулина, гемотрансфузии и применения иммуномодуляторов. Хорошие результаты получены при введении внутримышечно

иммуномодулятора циклоферона (250 мг на 1-й, 2-й, 4-й, 6-й и т.д. дни. На курс - 2500 мг.)

Показан также лейкинферон, который вводится дважды (по одной ампуле) до начала курса антибиотикотерапии, затем 2-3 раза в нед. в течение курса и дважды после окончания курса.

Критерии санации. Ввиду того, что антигены микоплазм долго сохраняются в крови и тканях, контрольные исследования нужно проводить не ранее, чем через 1 месяц после лечения. Для окончательного заключения о санации рекомендуем контрольные исследования проводить с помощью ПНР (см. раздел «Диагностика»).

При РА из синовиальной жидкости выделяют, кроме *M. fermentans*, другие виды микоплазм: *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *U. urealyticum*, *M. arthritidis*. Механизмы патогенеза артритов микоплазменной этиологии достаточно сложны и обсуждаются в специальной литературе (Прозоровский С.В. и др., 1995)

Диагностика микоплазменных инфекций (6, 7,11).

Ввиду того, что микоплазменные инфекции не имеют каких-либо специфических, свойственных только им клинических проявлений, для их выявления необходимо использовать методы лабораторной диагностики. Используют 3 группы методов:

- 1) Культуральные методы;
- 2) Иммунологические методы выявления антигенов микоплазм и антител к ним
- 3) Молекулярно-биологические методы.

Исследуемый материал.

При подозрении на респираторный микоплазмоз исследуют мазки из носоглотки, лаважную жидкость, мокроту, бронхиальные смывы, а также мазки-отпечатки тканей органов мертворожденных и абортированных плодов.

При урогенитальных инфекциях исследуют срединную порцию утренней мочи, соскобы со слизистой уретры, сводов влагалища, цервикального канала, материал, полученный при лапароскопии, амниоцентезе, мазки-отпечатки органов абортированных и мертворожденных плодов. При простатите исследуют секрет простаты, при мужском бесплодии - сперму

При заборе материала соблюдают те же правила, что и при исследовании на хламидиоз.

Культуральные методы. Для всех видов микоплазм и уреоплазм необходимы стеролы (холестерин и его производные) и жирные кислоты. Потребность в стеролах очень редко наблюдается у прокариот, мембраны которых их, как правило, не содержат. Микоплазмы нуждаются также в фосфолипидах, гликолипидах и фосфогликолипидах. Источником этих соединений является сыворотка крови животных, для большинства микоплазм - сыворотка крови лошади. Виды, ферментирующие глюкозу, лучше растут при более высоких значениях рН (8 - 8,5). Виды, гидролизующие аргинин и

мочевину - при более низких значениях рН (6,5 - 6,0). Требования к аэрации у разных видов различны. Большинство видов лучше растут в атмосфере газовой смеси, состоящей из 95% N₂ и 5% CO₂.

Микоплазмы можно культивировать на жидких, полужидких (0,3% агар) и плотных (1,3% агар) средах. Некоторые виды микоплазм (*M. pneumoniae*, *M. genitalium*) можно также выращивать на стекле и пластике в виде монослоя, как культуру клеток.

Большинство видов микоплазм размножаются медленно, культивирование продолжается несколько дней или даже недель (*M. pneumoniae*, *M. genitalium*). Кривая их роста в основном сходна с кривой роста бактерий. *M. hominis* достигает конца логарифмической или начала стационарной фазы роста только через 48 - 72 часа, титр клеток в популяции составляет к этому времени 10⁸ - 10⁹ КОЕ/мл. Такой титр сохраняется в стационарной фазе роста в течение 5-7 дней культивирования. Уреаплазмы имеют очень короткую стационарную фазу, их жизнеспособность резко падает уже через 24 ч. реже - 48 ч., когда погибает приблизительно 90% клеток, особенно в плохо забуференной среде.

Бульонные культуры микоплазм слегка опалесцируют, уреаплазмы не вызывают помутнения среды даже при титре 10⁸ КОЕ/мл. В толще полужидкого агара микоплазмы и уреаплазмы образуют светлое облачко по ходу укола пипетки, особенно хорошо заметное в проходящем свете.

На полутвердом агаре микоплазмы образуют колонии 0,1 - 0,3 мм в диаметре, либо равномерно зернистые, либо по форме похожие на яичницу-глазунью. Колонии уреаплазм имеют диаметр 0,01 - 0,03 мм. Колонии микоплазм, и тем более уреаплазм видны только при малом увеличении микроскопа (x100).

При выращивании на питательных средах микоплазмы проявляют чрезвычайно высокую требовательность к их составу и условиям культивирования, особенно это относится к патогенным микоплазмам, которые культивируются с большим трудом.

Питательные среды должны отвечать следующим требованиям:

1. Они должны содержать все предшественники, необходимые для синтеза макромолекул, что обеспечивается использованием вытяжки из говяжьего сердца и мозга, пептона, дрожжевого экстракта как источника фактора роста, ДНК, либо НАД (никотинамид-аденин-динуклеотид), либо ДПН (дифосфопиридиннуклеотид) в качестве пуринов и пиримидинов, которые микоплазмы синтезировать не могут, а получают в готовом виде из этих соединений с помощью ферментов.

2. Питательные среды должны обеспечивать микоплазмы источниками энергии. Они имеются в экстрактах, полученных при отваривании сердечной мышцы, печени и др. органов, и вносятся в среду дополнительно в виде глюкозы (для видов, ферментирующих глюкозу), аргинина (для видов, ферментирующих аргинин) и мочевины (для уреаплазм). При разложении этих компонентов изменяется рН среды, поэтому среда должна быть забуферена.

При выделении микоплазм из клинического материала необходимо посеять анализируемые пробы (0,1 мл) в **транспортную среду** (1 мл) - среду той же прописи, что и для культивирования, но без источников энергии (глюкозы, аргинина и мочевины) и с большим количеством антибиотиков для подавления сопутствующей флоры: пенициллина (1000 ед./мл) и любого антибиотика, подавляющего рост грибов. Посевы выдерживают 30 мин. при комнатной температуре, затем переносят в среду культивирования (0,1 мл на 1 мл среды) и помещают в термостат (37 С) на 3 дня (для выделения *U. urealyticum*), 7 дней (для *M. hominis*) и 3 недели (для *M. pneumoniae*, *M. genitalium*). О росте в бульоне судят по изменению цвета среды: *U. urealyticum* и *M. hominis* изменяют цвет среды из красного в красно-фиолетовый, при этом в случае *U. urealyticum* среда остается прозрачной, а *M. hominis* дает легкую опалесценцию. *M. pneumoniae*, *M. genitalium* изменяют цвет среды из красного в желтый. Для того чтобы убедиться, что изменение цвета среды связано с ростом микоплазм (уреаплазм) необходимо сделать высев из бульона на агар, приготовленный на той же основе и спустя указанные выше отрезки времени просматривать чашки при малом увеличении микроскопа. Для выделения *M. hominis*, *M. pneumoniae* и *M. genitalium* можно делать высев из транспортной среды непосредственно на чашки, минуя бульон.

Достоинством культуральных методов является их **100% специфичность и возможность получения чистой культуры** для дальнейшего исследования выделенных штаммов, в частности испытания их чувствительности к антибиотикам. Недостатками культуральных методов являются их низкая чувствительность, связанная с неадекватностью питательных сред, неспособность некоторых штаммов микоплазм расти в отсутствие живых клеток и длительность культивирования.

В приложении приводятся прописи сред, наиболее часто используемых для культивирования микоплазм (1) и уреаплазм (2).

Наиболее часто используемые серологические методы . Выявление антигенов.

1. Реакция агрегат - гемагглютинации (РАГА)

РАГА позволяет выявить наличие антигена микоплазм в сыворотке крови больного в концентрации 0,001 - 0,0001 мкг/мл (по белку). Особенность РАГА заключается в том, что для сенсibilизации эритроцитов используют агрегированные глютаровым альдегидом (ГЛА) белки иммунной сыворотки, при этом антитела вводятся в состав трехмерных белковых комплексов, вследствие чего часть активных центров антител отдалается от поверхности эритроцита и становится более доступной для детерминант антигена.

Постановка РАГА Реакцию ставят в планшетах микротитратора «Такачи» с V-образными лунками. Исследуемые пробы сывороток разводят нормальной сывороткой кролика до 0,2% концентрации. Затем делают несколько последовательных двукратных разведений (с помощью мерных петель или автоматических микропипеток), внося в лунки по 25 мкл, и добавляют в таком

же объеме эритроцитарный диагностикум. Планшеты инкубируют в течение 2 ч. при 37°C; полученные результаты учитывают по 4-крестной системе.

Учет результатов.

Контроли обеспечивают: 1) проверку специфичности тест-системы (сенсibilизированные эритроциты + разведения гетерологичных антигенов); 2) проверку чувствительности тест-системы, т.е. определение наибольшего разведения гомологичного антигена, дающего реакцию гемагглютинации с эритроцитами, сенсibilизированными иммунной сывороткой; 3) определение титров при возможной неспецифической реакции с сенсibilизированными эритроцитами. Для этого эритроциты, сенсibilизированные агрегированной нормальной кроличьей сывороткой, вносят в исследуемые пробы (в разных разведениях). Титр при неспецифическом взаимодействии обычно не превышает 1:4.

Минимальный диагностический титр 1:8.

1. Иммуноферментный анализ (ИФА) Чувствительность реакции - 0,001 - 0,0001 мкг/мл (по белку)

Постановка реакции. В лунки полистироловых планшетов вносят 100 мкл специфических иммуноглобулинов, выделенных из антиминоплазменной сыворотки кролика в концентрации 10 мкг/мл (по белку) в КББ; рН 9,6. Планшеты инкубируют в течение 18 ч при +4°C, после чего лунки трижды отмывают (по 5 мин) ФСБ с 0,05% раствором твина-20 и удаляют остатки буфера. В лунки вносят приготовленные на ФСБ с твином разведения исследуемых сывороток в объеме 100 мкл. После инкубации в течение 1 ч при 37°C трижды отмывают ФСБ с раствором твина-20. Затем в лунки вносят 100 мкл конъюгата, представляющего собой специфические иммуноглобулины, меченные пероксидазой хрена. Конъюгат разводят ФСБ с раствором твина-20 (рабочее разведение указано на этикетке ампулы). Смесь инкубируют в течение 1 ч при 37°C, лунки трижды отмывают от несвязавшегося конъюгата.

Реакцию «проявляют» путём внесения в лунки планшета 100 мкл свежеприготовленного субстрат-индикаторного раствора, содержащего 0,04% ортофенилендиамина, 0,006% H^2O^2 в 0,1 М цитратно-фосфатном буфере (рН 6,0) и инкубируют в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре. Реакцию останавливают путем добавления 1Н р-ра H_2SO_4 .

Учет результатов. Результат взаимодействия фермента с субстратом обнаруживают колориметрически (по оранжевому окрашиванию). При визуальном учете реакция считается положительной, если титр исследуемой сыворотки в 2 раза и более превышает таковой в контроле. При спектрофотометрическом учете результаты показатели ОП анализируемой пробы (при 492 нм) должны в 2 и более раз превышать показатели ОП контрольной пробы. Минимальный диагностический титр - 1:200. Специфичность реакции проверяют с помощью гетерологичных антигенов и торможения реакции избытком специфических антител. Дополнительным контролем является контроль субстрата и неспецифической адсорбции конъюгата.

2. Реакция непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ)

Данный метод может быть использован для быстрого обнаружения антигенов микоплазм в некоторых биосубстратах: в мазках из носоглотки, мокроте, плевральной жидкости, мазках из уретры, влагалища и др.

Принципы этой реакции, методы забора и подготовки материала такие же, как и при исследовании на хламидиоз. Соскоб или каплю исследуемого материала наносят на чистое и обезжиренное предметное стекло и распределяют тонким слоем. Препарат подсушивают на воздухе и фиксируют в охлажденном ацетоне или этаноле (96°) в течение 15 мин. Фиксированные препараты могут сохраняться в холодильнике при +4 С. Препараты должны содержать большое количество клеток.

Постановка реакции. Препарат делят стеклографом на 2 части для одновременного контролирования специфичности метода. Одну часть обрабатывают специфической гипериммунной кроличьей сывороткой в рабочем разведении. После этого препарат помещают во влажную камеру на 30 мин при 37 °С.

Рабочее разведение предварительно определяют на серии одинаковых препаратов, приготовленных из отмытой бульонной культуры микоплазм или отпечатков колоний. Наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдается специфическое свечение клеток микоплазм, принимают за рабочее. Последовательные разведения иммунной сыворотки делают 0.001 - 0,15 М раствором ФСБ; рН 7,2 - 7,4.

Через 30 мин препараты промывают в 3-х порциях ФСБ (рН 7,2 - 7,4), подсушивают на воздухе и обрабатывают всю поверхность антителами, мечеными флюорохромом, взятыми из рабочего разведения. Рабочее разведение меченого антивидового глобулина указано на каждой ампуле и обычно соответствует оптимальному. Затем препараты помещают на 30 мин во влажную камеру при 37°С, трижды промывают ФСБ, споласкивают водопроводной водой, подсушивают на воздухе и просматривают под люминесцентным микроскопом в падающем свете с иммерсией.

Учет и оценка результатов. Положительная реакция проявляется в виде интенсивного изумрудно-зеленого гранулярного свечения микоплазм на мембранах клеток и в межклеточном пространстве.

Результат считается положительным, если в препарате обнаруживается не менее 10 светящихся зеленых гранул.

Данный метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью, он применим для выявления микоплазм практически в любом материале и позволяет количественно оценить массивность инвазии возбудителя. Метод используют для выявления тех видов микоплазм, к которым имеются специфические гипериммунные сыворотки, но отсутствуют тест-системы для прямой РИФ.

3. Реакция прямой иммунофлюоресценции (РПФ)

Для обнаружения антигенов *M. hominis*, *U. urealyticum*, и *M. pneumoniae* в настоящее время выпускаются препараты отечественного производства («МикогомоФлюоСкрин», «УреагениФлюоСкрин» и «МикопневмоФлюоСкрин», ЗАО «Ниармедик-Плюс» на базе НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН).

В качестве флюоресцентной метки используют ФИТЦ (флюоресцеинизотиоцианат), микоплазмы и уреоплазмы окрашиваются в ярко-зеленый цвет, выявляются на мембране клеток и в межклеточном пространстве. Техника постановки реакции изложена в инструкциях к препаратам. Метод требует минимальной затраты времени (=1.5 ч).

Выявление антител к микоплазмам.

Антитела к микоплазмам выявляют с помощью различных реакций; ингибиции роста (РИР), ингибиции метаболизма (РИМ), микоплазмацидного теста, РСК и др. В последние годы наиболее часто применяют реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА) и иммуноферментный анализ (ИФА). Материалом для исследования служит сыворотка крови.

Часто приходится исследовать парные сыворотки, т.к. диагностическое значение имеет нарастание титра антител в динамике заболевания в 4 и более раз. При урогенитальном микоплазмозе выявление антител имеет меньшую диагностическую ценность, чем выявление антигенов, т.к. инфекция, как правило, имеет хроническое течение, а «урогенитальные» микоплазмы являются слабыми антигенными раздражителями. Тем не менее и при урогенитальных микоплазмозах в ряде случаев необходимо проводить исследование на наличие антител.

1. Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА)

Чувствительность реакции 0,01 - 0,001 мкг/мл (по белку).

Постановка реакции. Постановку реакции осуществляют в планшетах микротитратора «Такачи», исследуемые сыворотки разводят в 0,2% р-ре нормальной сыворотки кролика. Для двукратного разведения сыворотки больных используют петли или микропипетки на 25 мкл. В таком же объеме вносят в лунки тест-эритроциты. После инкубации в течение 2 ч при 37°C проводят учет полученных результатов по 4-крестной системе.

Учет результатов (++++) - агглютинат выстилает дно всей лунки; (++++) - агглютинат выстилает 50% всей поверхности лунки; (++) - агглютинат выстилает 25% поверхности лунки; (+) - агглютинат выстилает небольшой ореол вокруг осадка; (-) - агглютинат образует компактный осадок на дне лунки.

Положительными считаются реакции с четкими показателями: (++++), (++++) и (++) . Диагностический титр - 1:32.

Контроли обеспечивают: 1) проверку специфичности тест-системы (сенсibilизированные эритроциты + разведения гетерологичных антител); 2) проверку чувствительности тест-системы, т.е. определение наибольшего разведения гомологичных антител (антисыворотки).

При микоплазмозе диагностическое значение придают увеличению титров специфических антител в парных сыворотках крови (в 4 раза и более) в динамике заболевания. Первую пробу сыворотки крови получают у пациента в начале заболевания (желательно в первые 7 дней), вторую - через 10-14 дней от начала заболевания.

2. Иммуноферментный анализ (ИФА)

Чувствительность реакции 0,001 - 0,0001 мкг/мл (по белку).

Постановка реакции. В лунки полистиролового планшета вносят по 100 мкл растворимого антигена микоплазм (концентрация 10 мкг/мл) в (КББ); рН 9,4. Антигены представляют собой белковую фракцию, выделенную из цитоплазматической фракции клеток микоплазм при введении $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$. Планшеты инкубируют при 4°C в течение 18 ч, затем трижды отмывают по 5 мин ФСБ с 0,05% раствором твина-20 и тщательно удаляют остатки буфера. В лунки, сенсibilизированные антигеном, вносят последовательно двукратно разведенные исследуемые сыворотки в объеме 100 мкл либо титруют автоматической микропипеткой в ФСБ с раствором твина-20. Начальное разведение сывороток 1.100. После инкубации в течение 1 ч при 37°C планшеты трижды отмывают ФСБ с 0,05% раствором Твина-20.

В лунки вносят конъюгат, содержащий меченые пероксидазой хрена антитела (кролика) к глобулинам сыворотки человека в рабочем разведении в объеме 100 мкл. Для разведения используют ФСБ с твином. После инкубации в течение 1 ч при 37°C планшеты трижды отмывают от избытка конъюгата и вносят 100 мкл свежеприготовленного субстрат-индикаторного раствора, содержащего 0,04% раствор ортофенилендиамина, 0,05% H_2O_2 в 0,1 М цитратно-фосфатном буфере и инкубируют в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре. Реакцию останавливают путем добавления 1Н р-ра H_2SO_4 .

Учет результатов. Интенсивность окрашивания в лунках определяют спектрофотометрически (при длине волны 492 нм) или визуально. При визуальном учете реакция считается положительной, если титр исследуемой сыворотки в 2 раза и более превышает таковой в контроле. При спектрофотометрическом учете результаты показатели оптической плотности (ОП) анализируемой пробы должны в 2 и более раз превышать показатели ОП контрольной пробы. ЗАО «Ниармедик-плюс» при НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН выпускает препараты для выявления антител к *M. hominis* ("МикоплазмоСкрин"), *U. urealyticum* ("УреагениСкрин") и *M. pneumoniae* ("МикопневмоСкрин") с соответствующими инструкциями по их применению.

Молекулярно-биологические методы.

Полимеразная цепная реакция ПЦР)

Для реакции амплификации берут 25 - 50 мкл среды. Смесь, используемая для реакции, содержит: 60 ммоль. трис-НСl (рН 8,8), 16,6 ммоль. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 ммоль MgCl_2 , 10 ммоль каждого из четырех дезоксирибонуклеотид-трифосфатов, по 12 нмоль каждого праймера, ДНК-мишень (до 1 мкл) и 2 ед.

Тaq-полимеразы. Для проведения ПЦР используют амплификатор. Программа амплификации включает 30 - 35 циклов в режиме: денатурация - при 94 °С в течение 1 мин, отжиг праймеров - при температуре от 45 до 65 °С (величина рассчитывается теоретически, что соответствует температуре плавления используемых праймеров) - в течение 0,5 мин, синтез - при 72 °С в течение 2 мин. Продукты амплификации после электрофореза выявляют в 1,2% агарозном геле, окрашенном этидиум-бромидом. Наличие фрагмента ДНК с заданным показателем учитывается в качестве положительного результата.

Ампликон выявляют также путем гибридизации продукта амплификации с биотилированным или меченым радиоактивным изотопом олигонуклеотидом, комплементарным последовательности ДНК, расположенной внутри амплифицируемого фрагмента. Гибридизацию проводят на фильтрах или в микропланшетах. Последнее дает возможность количественно оценивать результаты ПЦР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение можно отметить, что проблемы диагностики и лечения микоплазменной инфекции в России в целом схожи с общемировыми, несмотря на особенности, обусловленные социально-экономической ситуацией в нашей стране

Приведены данные по диагностике, клинике и терапии доказывают то, что, микоплазменная инфекция остается достаточно широко распространенной инфекцией и является одной из актуальных медико-социальных проблем в нашей стране.

Необходимо дальнейшее продолжение открытой дискуссии с целью выработки четких рекомендаций для лабораторных работников и врачей-клиницистов. В целом по стране лабораторная диагностика микоплазмоза часто ограничивается только культуральным исследованием. Поэтому внедрение современного метода генодиагностики (ПЦР) становится выходом из тупиковой ситуации при постановке диагноза - микоплазмоза.