

УДК 618.15-002-022.7-078

ВОЗМОЖНОСТИ ИННОВАЦИОННОГО МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА В ОПРЕДЕЛЕНИИ ЭТИОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМОЙ МИКРОБИОТЫ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА ПАЦИЕНТОК РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

Евстигнеева Н.П., Аминев П.Г., Герасимова Н.А., Кузнецова Ю.Н., Зильберберг Н.В.

ГБУ СО «Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии» Министерства здравоохранения Свердловской области, Екатеринбург, e-mail: evstigneeva-np@yandex.ru

Проведено комплексное клинико-лабораторное обследование 378 пациенток, в возрасте от 18 до 45 лет, включающее идентификацию микробиоты методом масс-спектрометрического профилирования бактерий и исключение возбудителей ИППП. Наиболее часто выделялись: лактобактерии (69,3%), дрожжеподобные грибы рода *Candida* (19,0%), представители семейства *Enterobacteriaceae* (18,9%), бактерии рода *Staphylococcus* (18,5%), *Streptococcus* (12,7%), *Enterococcus* (10,1%), а также *G. vaginalis* (13,8%), *U. urealyticum* (12,9%), *M. hominis* (7,1%). Благодаря применению высокотехнологичного метода MALDI-TOF MS расширился спектр идентифицируемых видов *Streptococcus* (7), *Corynebacterium* (4), культивируемых лактобактерий (8). Выделенные штаммы *U. urealyticum* и *M. hominis* в 100% были чувствительны к доксициклину, прistinамицину, джозамицину. Отмечена 100% чувствительность *M. hominis* к ципрофлоксацину, офлоксацину. Изоляты *U. urealyticum* в 71,4% были резистентны, в 22,4% умеренно-чувствительны, в 6,2% чувствительны к ципрофлоксацину; в 38,8% резистентны, в 53,1% умеренно-чувствительны, в 8,1% чувствительны к офлоксацину. Отмечена 100% резистентность штаммов *M. hominis* к азитромицину, рокситромицину. 97,9% изолятов *U. urealyticum* были чувствительны к азитромицину. В 95,8% случаев отмечена чувствительность уреоплазм к рокситромицину.

Ключевые слова: микробиота влагалища, масс-спектрометрия, воспалительные заболевания уrogenитального тракта, чувствительность уреоплазм и микоплазм к антимикробным препаратам

INNOVATIVE MASS SPECTROMETRIC METHOD IN DETERMINING ETIOLOGICALLY SIGNIFICANT MICROBIOTA OF THE UROGENITAL TRACT OF PATIENTS OF REPRODUCTIVE AGE

Evstigneeva N.P., Amineva P.G., Gerasimova N.A., Kuznetsova Y.N., Zilberberg N.V.

Ural Scientific Research Institute of Dermatology and Immunopathology, Ekaterinburg, e-mail: evstigneeva-np@yandex.ru

Complex clinical and laboratory examination of 378 patients ranging in age from 18 to 45 years has been conducted the identification of urogenital microflora by the method of time-of-flight mass spectrometry and included the exclusion of STI. The most frequently isolated: lactobacilli (69,3%), yeast-like fungi of the genus *Candida* (19,0%), members of the family *Enterobacteriaceae* (18,9%), bacteria of the genus *Staphylococcus* (18,5%), *Streptococcus* (12,7%), *Enterococcus* (10,1%), as well as *G. vaginalis* (13,8%), *U. urealyticum* (12,9%), *M. hominis* (7,1%). Through the use of high-tech method MALDI TOF MS expanded the range of identified species of *Streptococcus* (7), *Corynebacterium* (4), cultured lactobacilli (8). The isolated strains *U. urealyticum* *M. hominis* and 100% were susceptible to doxycycline, pristinamycin, josamycin. There was a 100% *M. hominis* sensitivity to ciprofloxacin, ofloxacin. Isolated *U. urealyticum* 71.4% were resistant, 22.4% moderately sensitive, 6.2% are sensitive to ciprofloxacin; in 38.8% of resistance, 53.1% moderately sensitive to 8.1% sensitive to ofloxacin. There was a 100% resistant strains *M. hominis* to azithromycin, roxithromycin. *U. urealyticum* 97.9% of the isolates were susceptible to azithromycin. In 95.8% of cases marked sensitivity to ureaplasmas roxithromycin.

Keywords: vaginal microbiota, mass spectrometry, inflammatory diseases of the urogenital tract, antimicrobial sensitivity *Ureaplasma* and *Mycoplasma*

Одной из проблем сохранения репродуктивного здоровья нации является увеличение частоты воспалительных заболеваний, ассоциированных с условно-патогенной микрофлорой (УПМ) и увеличение спектра этиологически значимых микроорганизмов из состава резидентной микробиоты уrogenитального тракта (УГТ) при одновременном снижении заболеваемости инфекциями, передающимися половым путем (ИППП). Следствием нарушения микробиоты УГТ является увеличение риска развития воспалительных заболеваний органов малого таза (ВЗОМТ), осложнения течения

беременности и родов, снижение качества жизни, формирование резистентных штаммов бактерий [1, 2, 3, 4, 5, 7, 10]. Одним из триггерных факторов формирования бактериального вагиноза является, в том числе, и наличие некоторых видов лактобактерий (*L. iners*) [6]. Половые партнеры пациенток с хроническими воспалительными заболеваниями УГТ, обусловленными условно-патогенной микрофлорой, достоверно чаще страдают эректильной дисфункцией, простатитами, нарушением фертильности [9]. Условно-патогенные микроорганизмы при наличии у пациента клинико-лабораторных

признаков уретрита, выделяются в диагностических титрах в три раза чаще, чем облигатные патогены и проявляют высокую резистентность к антибактериальным препаратам [8].

Активно развивающимся направлением молекулярной биологии является матричная лазерная десорбционная времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI-TOF-MS) – протеомный анализ, метод идентификации молекул путем измерения отношения их массы к заряду в ионизированном состоянии. Использование прямой МАЛДИ масс-спектрометрии для идентификации и типирования микроорганизмов возможно благодаря регистрации уникальных белковых масс-спектров, воспроизводимых для семейств, родов, видов и подвидов микроорганизмов, с чувствительностью 10^5 – 10^6 клеток и 100% специфичностью. В связи с тем, что наличие условно-патогенной микрофлоры в урогенитальном тракте не является доказательством ее этиологической роли в формировании воспаления, только учет количественных соотношений отдельных видов микроорганизмов может характеризовать состояние вагинального микроценоза и степень его нарушения.

Цель исследования

Оценить возможности протеомного анализа для видовой идентификации условно-патогенных микроорганизмов методом масс-спектрометрического профилирования бактерий у пациенток репродуктивного возраста с воспалительным процессом урогенитального тракта.

Материалы и методы исследования

С целью изучения качественного и количественного состава факультативно-анаэробной и микроаэрофильной микрофлоры влагалища проведено комплексное клиничко-лабораторное обследование 378 пациенток репродуктивного возраста (18 – 45 лет) (средний возраст $31,4 \pm 0,5$ года) с жалобами на гной-

ные или слизисто-гнойные выделения, дискомфорт и/или зуд наружных половых органов, диспареунию, с наличием признаков воспаления во влагалище, которое включало идентификацию микрофлоры методом масс-спектрометрического профилирования бактерий и исключение облигатных возбудителей ИППП. Критерии включения: возраст 18–45 лет; наличие подписанного информированного добровольного согласия на участие в исследовании; диагноз вагинит, подтвержденный микроскопическим и микробиологическим методами, объективной клинической картиной. Критерии исключения: возраст моложе 18 и старше 45 лет, наличие ИППП (положительные результаты лабораторных тестов на наличие *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *M. genitalium*, вируса простого герпеса (HSV), вируса папилломы человека (HPV), сифилиса, ВИЧ, предшествующая антибактериальная терапия в течение последних 3 месяца до исследования, невозможность посещения клиники. Подготовка материала для оценки урогенитальной микрофлоры выполнялась в соответствии с приказом МЗ СССР № 535 от 22.04.1985 г. «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». Первичный посев с полуколичественной оценкой роста микроорганизмов проводили на селективные и дифференциально-диагностические питательные среды: 5% кровяной агар, агар MRS для лактобактерий и агар Сабуро для грибов. Степень микробной обсемененности определяли в пересчете на тампон – КОЕ/т. Все посевы культивировали по стандартной методике при температуре 36°C в течение 24–48 часов. Культивирование микроаэрофилов осуществляли в CO_2 инкубаторе при 5% концентрации углекислого газа.

Идентификация выделенных культур микроорганизмов проводилась на анализаторе VITEK MS (BioMerieux, Франция) методом MALDI – TOF (матричная лазерная время-пролетная масс-спектрометрия). Экстракция белков осуществлялась на одноразовом слайде с использованием готового матрикса для VITEK MS. Интерпретация результатов проводилась с использованием базы данных VITEK MS, состоящей из клинически значимых видов и расширенного классификатора спектров.

Для выявления представителей семейства *Mycoplasmataceae* использовались наборы «Mycfast Evolution 3» (ELITech Microbio, Франция) с определением чувствительности к антимикробным препаратам.

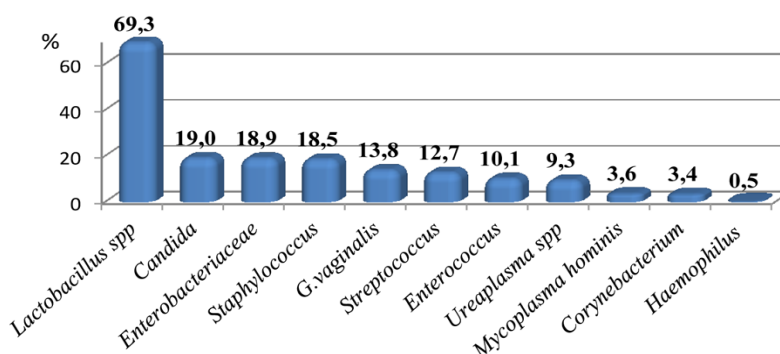


Рис. 1. Факультативно-анаэробная и микроаэрофильная микрофлора урогенитального тракта пациенток репродуктивного возраста ($n = 378$)

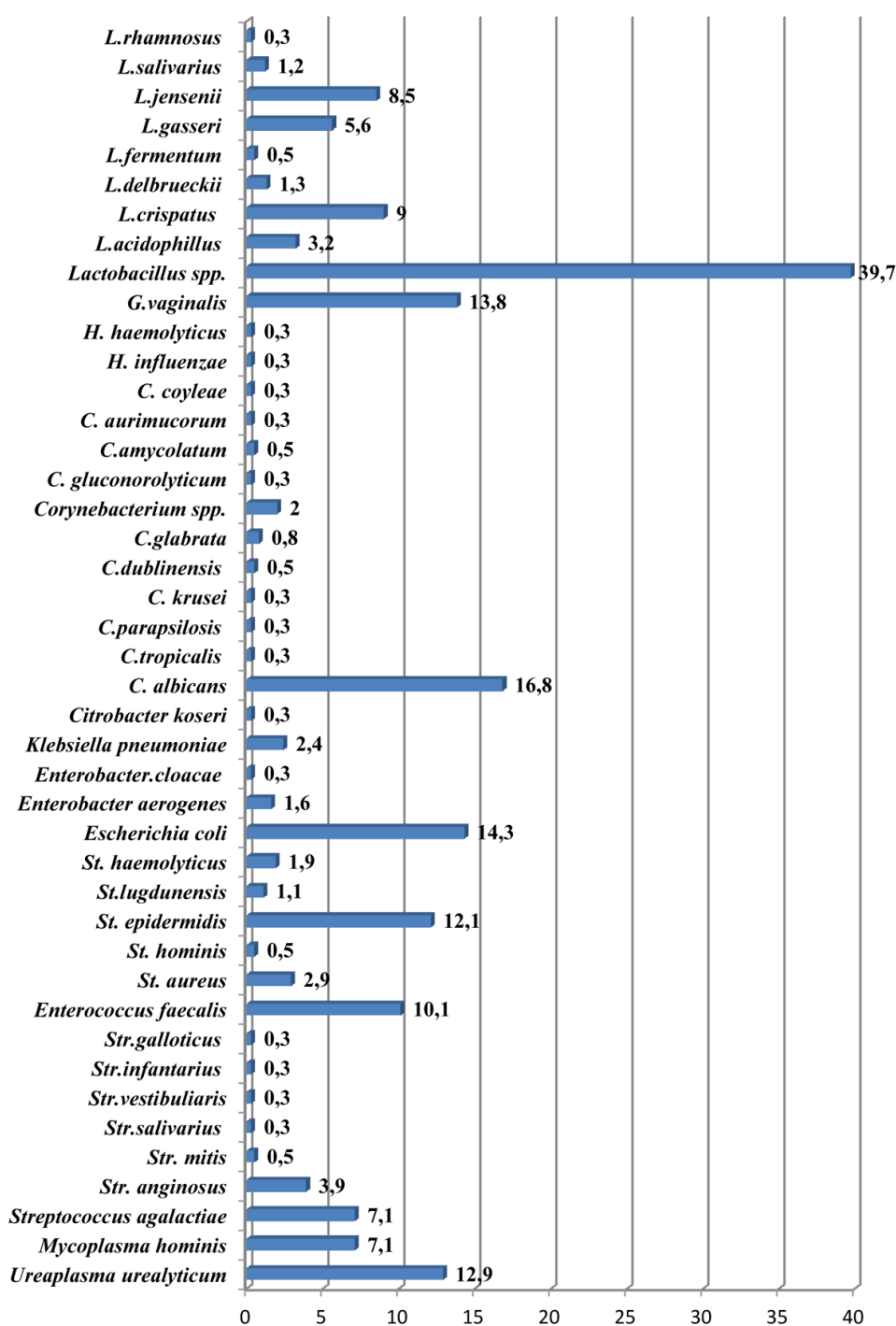


Рис. 2. Частота обнаружения резидентных и транзитных условно-патогенных микроорганизмов у пациенток репродуктивного возраста ($n = 378$), * идентифицированная методом масс-спектрометрии. * Поливариантный признак

Результаты исследования и их обсуждение

Основными представителями микрофлоры влагалища были: лактобактерии (69,3%), дрожжеподобные грибы рода

Candida (19,0%), представители семейства *Enterobacteriaceae* (18,9%), бактерии рода *Staphylococcus* (18,5%), *Streptococcus* (12,7%), *Enterococcus* (10,1%), а также *G. vaginalis* (13,8%), грамположи-

тельные палочки рода *Corynebacterium* (3,4%), грамотрицательные палочки рода *Haemophilus* (0,5%), *Ureaplasma spp.* были обнаружены у 9,3% пациенток, *Mycoplasma hominis* – 3,6%, ассоциации *Ureaplasma spp.* и *Mycoplasma hominis* – 3,8% (рис. 1).

Микроскопия нативных мазков выявила воспалительную реакцию слизистой оболочки влагалища у 72,5% пациенток: 10–20 лейкоцитов в поле зрения – у 19,9%, 20 – 80 лейкоцитов – у 40,9% и у 11,7% более 80 лейкоцитов в поле зрения. У 27,5% пациенток количество лейкоцитов в мазках было в пределах нормы (до 10 в поле зрения).

Полная информация о микробиоте влагалища пациенток, идентифицированной методом масс-спектрометрии представлена на рис. 2.

У 116 пациенток (30,7%) отсутствовал рост культивируемых на MRS агаре

лактобактерий, которые обеспечивают колонизационную резистентность влагалища и препятствуют чрезмерному размножению и транслокации условно-патогенных микроорганизмов. В 150 (39,7%) случаев определение осуществлялось до рода (*Lactobacillus spp.*). Видовое белковое профилирование 112 образцов с лактобактериями (29,6%), позволило идентифицировать следующие их виды: *L. crispatus* (30,4%), *L. jensenii* (28,6%), *L. gasseri* (19,6%), что опровергает ранее существовавшее мнение о доминирующем положении *L. acidophilus* (10,7%). В меньшей степени встречались *L. delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* (рис. 3). У 53,8% пациенток лактобактерии выделялись в высоких титрах (10^7 КОЕ/г), у 46,2% в низких титрах (10^5 КОЕ/г).

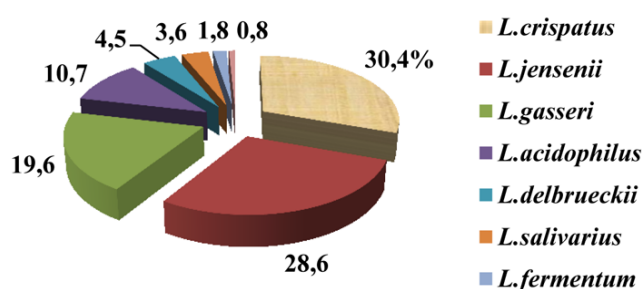


Рис. 3. Удельный вес идентифицированных лактобактерий (n = 112)

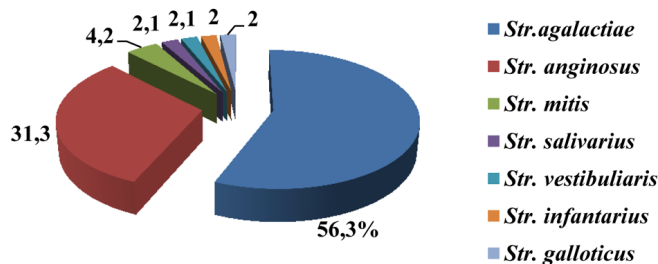


Рис. 4. Удельный вес идентифицированных видов семейства Streptococcaceae p. Streptococcus (n = 48)

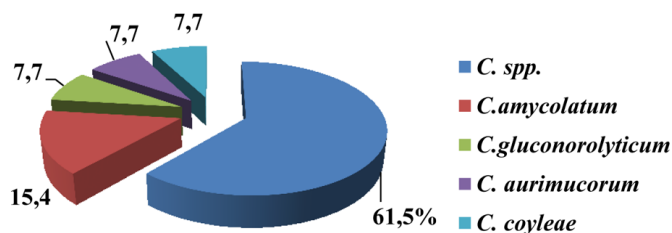


Рис. 5. Удельный вес идентифицированных видов p. Corynebacterium

Удельный вес идентифицированных видов семейства *Streptococcaceae* представлен на рис. 4.

Удельный вес идентифицированных видов рода *Corynebacterium* представлен на рис. 5.

Метод, основанный на масс-спектрометрическом профилировании рибосомальных белков микроорганизмов, позволил провести довидовую идентификацию культивируемых лактобактерий, коринебактерий и стрептококков группы *viridans* (всего 108 культур), которые в рутинной лабораторной практике идентифицируются до рода. Проведенные исследования показали, что у пациенток с лейкоцитарной реакцией в монокультуре в диагностически значимых титрах (более 10^4 КОЕ/т) в 3,8 раза чаще выявлялся *S. aureus*, факультативно-анаэробные бактерии (энтеробактерии, *St. agalactiae*, *E. faecalis*), *L. gasseri*, 1,4 раза чаще дрожжеподобные грибы рода *Candida*. У 52,9% пациенток с выраженной лейкоцитарной реакцией условно-патогенные микроорганизмы выделялись в титрах 10^4 - 10^7 КОЕ/т, у 47,1% пациенток – в высоких титрах 10^8 - 10^9 КОЕ/т. У каждой четвертой пациентки с воспалительным процессом урогенитального тракта диагностировались микробные ассоциации из 2 условно-патогенных агентов. У пациенток без лейкоцитарной реакции (менее 10^4 лейкоцитов в поле зрения) половые пути колонизировались дрожжеподобными грибами рода *Candida* (16%) в титре более 10^4 КОЕ/т, при этом обычно в ассоциации с другими условно-патогенными возбудителями: *E. coli*, *St. agalactiae*, *E. faecalis*, *G. vaginalis*, *St. aureus*.

Выделенные штаммы *U. urealyticum* (n = 49) и *M. hominis* (n = 27) в 100% были чувствительны к антимикробным препаратам тетрациклинового ряда (доксикалин), макролидам (пристинамицин, джозамицин). По отношению к фторхинолонам получены следующие результаты: отмечена 100% чувствительность выделенных штаммов *M. hominis* к ципрофлоксацину, офлоксацину. Изоляты *U. urealyticum* в 71,4% были резистентны, в 22,4% умеренно-чувствительны, в 6,2% чувствительны к ципрофлоксацину; в 38,8% резистентны, в 53,1% умеренно-чувствительны, в 8,1% чувствительны к офлоксацину. Отмечена 100% резистентность штаммов *M. hominis* к азитромицину, рокситромицину. 97,9% изолятов *U. urealyticum* были чувствительны к азитромицину, 2,1% – резистентны. В 95,8% случаев отмечена чувствительность уреоплазм к рокситромицину, 2,1% – умеренно-чувствительны, 2,1% – резистентны.

У 11,4% пациенток *Ureaplasma spp.* и *Mycoplasma hominis* выявлялись одновременно с факультативно-анаэробными микроорганизмами.

Заключение

Таким образом, комплексное клинико-лабораторное обследование пациенток с объективными и субъективными симптомами воспаления, с использованием инновационной микробиологической технологии масс-спектрометрии, позволило установить частоту встречаемости, расширить представления о видовом разнообразии условно-патогенной микрофлоры, провести количественную оценку. Установлено, что выделенные штаммы *U. urealyticum* и *M. hominis* в 100% были чувствительны к доксициклину, пристинамицину, джозамицину, офлоксацину (61,2-100% соответственно), ципрофлоксацину (28,6-100%). Отмечена 100% резистентность *M. hominis* к азитромицину, рокситромицину, к которым большинство штаммов *U. urealyticum* были чувствительны. Увеличен спектр идентифицируемых видов *Streptococcus*, *Corynebacterium*, лактобактерий с применением высокотехнологичного метода MALDI TOF MS, что позволит уточнить этиологию воспалительного процесса урогенитального тракта.

Список литературы

1. Баткаев Э.А., Рюмин Д.В., Бабаев О.Р. Роль условно-патогенной микробиоты в патогенезе постспецифических изменений урогенитального тракта // Врач. – 2009. – № 4. – С. 72-74.
2. Зильберберг Н.В., Воронова О.А., Евстигнеева Н.П. Сравнительная характеристика неспецифических инфекций нижних отделов половых путей у женщин // Практическая медицина. – 2011. – № 6(54). – С. 80-84.
3. Ильин И.И. Негонококковые уретриты у мужчин. – М.: Медицина, 1991. – 288 с.
4. Кунгуров Н.В. Негонококковые уретриты у мужчин, ассоциированные с условно-патогенной микрофлорой / Н.В. Кунгуров, Н.И. Скидан, А.П. Горбунов, Н.П. Евстигнеева, В.А. Игликов. – Екатеринбург. – 2011. – 104 с.
5. Липова Е.В., Болдырева А.С., Чекмарев А.С., Аджар К. Диагностика урогенитальных заболеваний, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, у мужчин репродуктивного возраста. // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2011. – № 3. – С. 52-55.
6. Мелкумян А.Р., Припутневич Т.В., Анкирская А.С. и др. Видовой состав лактобактерий при различном состоянии микробиоты влагалища у беременных // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2013. – Т. 15. – № 1. – С. 72-79.
7. Рахматулина М.Р., Шаталова А.Ю. Современные представления о микроценозе вагинального биотопа и его нарушениях у женщин репродуктивного возраста // Вестник дерматологии и венерологии. – 2009. – № 3. – С. 38-42.
8. Чекмарев А.С. Сравнительная эффективность методов идентификации возбудителей заболеваний урогенитального тракта у мужчин: Автореф. дис. канд. мед. наук. – М., 2012. – 25 с.
9. Якубович А.И., Чуприн А.Е. Уретрогенный простатит: этиология, патогенез, клиника, современные подходы к терапии // Consilium medicum. – 2003. – том 5. – № 3. – С. 164-167.
10. Donders G.G. Definition and classification of abnormal vaginal flora / G.G. Donders // Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. – 2007 Jun. 21(3):355-73. Epub 2007 Apr 16.