

<sup>1</sup>Руденкова Т. В., <sup>2</sup>Костюк С. А., <sup>1</sup>Рубаник Л. В.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАЗРАБОТАННОЙ СРЕДЫ  
ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ВЫЯВЛЕНИЯ *Mycoplasma*  
*GENITALIUM***

<sup>1</sup> Белорусская медицинская академия последипломного образования,  
г. Минск

<sup>2</sup> Республиканский научно-практический центр эпидемиологии  
и микробиологии, г. Минск, Беларусь

*Mycoplasma genitalium* является трудно культивируемым микроорганизмом. Существует несколько сред, пригодных для культивирования данного возбудителя: модифицированная питательная среда Хайфлика [1], питательная среда на основе триптического гидролизата мышцы говяжьего

сердца и мясной воды [2], данные среды пригодны для культивирования большинства видов микоплазм, в том числе и *M. genitalium*. Основным недостатком данных питательных сред является использование пенициллина в качестве антимикробного агента, т. к. большинство микроорганизмов сопутствующей микрофлоры, присутствующих в биологических образцах наряду с *M. genitalium*, устойчивы к действию данного препарата. В результате в культуре происходит размножение не только микоплазм, но и ассоциированной флоры, что делает невозможным получение чистой культуры *M. genitalium*. Лучшие результаты при культивировании достигаются при использовании среды SP-4 [3], которая содержит комплекс антибактериальных препаратов, включающий полимиксин В, амфотерицин В и пенициллин. К недостаткам использования данной среды можно отнести необходимость применения дополнительных тестов для установления вида микоплазм, присутствующих в биологическом образце (культуре), а также трудности в получении чистых изолятов *M. genitalium*. Поиск оптимального состава питательной среды, использование которой позволяло бы не только обнаруживать присутствие данного микроорганизма в биологическом материале, но и получать чистые культуры для проведения работ по изучению свойств возбудителя, является актуальной задачей, над которой работают исследователи различных стран.

**Целью** исследования было провести изучение возможности использования разработанной питательной среды для выявления *M. genitalium* и получения чистых культур микроорганизма.

**Материалы и методы.** Для проведения исследования использовали биологический материал от пациентов, инфицированных *M. genitalium* (n = 37). Инфицирование было установлено с применением метода ПЦР в режиме реального времени («АмплиСенс», РФ). Посев биологического материала проводили на разработанную «Питательную среду для культивирования и выявления *M. genitalium*» и питательную среду SP-4 (Hardy Diagnostics, США). Посев проводили в 24-луночные стерильные культуральные планшеты. Культуры инкубировали при 37 °С и атмосфере 10 % (vol/vol) CO<sub>2</sub> в течение 28 дней. Контроль роста возбудителя в культуре осуществляли каждые 7 дней. Наличие роста возбудителя оценивали двумя методами:

- визуально — по изменению цвета рН-индикатора питательной среды с красной на желтую, что свидетельствовало о размножении *M. genitalium*;
- с применением метода количественной ПЦР в режиме реального времени («АмплиСенс Mycoplasma genitalium-скрин-титр-FL», РФ).

#### **Результаты и обсуждение**

Для получения «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasmas genitalium*» брали: «Основу микоплазматического бульона» («Mycoplasma Broth Base») (Becton Dickinson, США) — 0,35 г, трип-

тон — 1 г, пептон — 0,53 г, глюкозу — 0,5 г, дистиллированную воду — 61,5 мл, pH раствора доводили с помощью 1 N NaOH до 7,6–7,8, стерилизовали при 121 °С 15–20 минут, охлаждали при комнатной температуре. Далее в раствор добавляли следующие стерильные компоненты: среду CMRL-1066 с глютамином, но без NaHCO<sub>3</sub> — 5 мл, свежий дрожжевой экстракт (25 %) — 3,5 мл, дрожжевой раствор (2 %) — 10 мл, эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота (предварительно прогретую при 56 °С в течение 1 ч) — 17 мл, феноловый красный (0,1 %) — 2 мл. Объем полученного раствора доводили до 100 мл 0,6 % агарозой, добавляли ципрофлоксацин — 0,25 мкг/мл, полимиксин В — 500 мкг/мл, флуконазол — 50 мкг/мл, инсулин — 0,05 ед./мл.

С использованием метода визуальной оценки результата в 10,81 % образцов (n = 4) изменения окраски были отмечены уже на 14 день проведения эксперимента в обеих питательных средах, а через 21 день после инокуляции материала во всех образцах культуры (n = 37) было отмечено изменение окраски как в среде SP4, так и в «Питательной среде для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» с красной на желтую, что свидетельствовало о росте *M. genitalium*.

С применением метода количественной ПЦР в режиме реального времени рост числа копий ДНК возбудителя был отмечен уже на 14 день культивирования ( $2,4 \pm 1,1 \times 10^2$  ГЭ/мл для среды SP4;  $3,1 \pm 1,7 \times 10^2$  ГЭ/мл для разработанной среды). На 21 день эксперимента количество ДНК возбудителя возросло до  $7,2 \pm 2,4 \times 10^3$  ГЭ/мл для среды SP4 и  $8,9 \pm 3,1 \times 10^3$  ГЭ/мл для разработанной среды. Достоверных отличий количественных показателей уровня ДНК *M. genitalium* при использовании среды SP4 и разработанной питательной среды выявлено не было ( $p > 0,05$ ).

На 28 сутки культивирования для определения чистоты полученных культур *M. genitalium* в них было проведено выявление ДНК сопутствующих микроорганизмов (*Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma spp.*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida spp.*), которые могли изначально присутствовать в биологическом материале, полученном от пациентов. Исследование проводили с применением метода ПЦР в режиме реального времени. В образцах культур, в которых изначально, кроме *M. genitalium*, присутствовали *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* (n = 16), при использовании для культивирования питательной среды SP4 была выявлена ДНК данных микроорганизмов в 87,5 % случаев (n = 14). При использовании разработанной «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» в культурах не было выявлено ДНК других видов микоплазм (*M. hominis*, *U. urealyticum*). Все культуры *M. genitalium*, выращенные как с использованием среды SP4, так и с использованием «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*», не содержали ДНК *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *Candida spp.*

## **Выводы**

Разработанная «Питательная среда для культивирования и выявления *M. genitalium*» дает возможность обнаруживать присутствие в биологическом материале *M. genitalium* при культивировании в течение 21 дня, при этом активное размножение возбудителя начинается уже к 14 дню, что подтверждается результатами количественной ПЦР в режиме реального времени. Применение данной питательной среды также дает возможность получения чистых культур *M. genitalium* без включения других генитальных микоплазм, что является особенно важным при проведении работ по изучению свойств возбудителя.

## **ЛИТЕРАТУРА**

1. *Bergan, T. Methods in Microbiology* / T. Bergan, J. R. Norris. Academic Press (London) ltd., 1979. Vol. 13. P. 102.
2. *Раковская, И. В. Микоплазмы и микоплазмозы человека : пособие для врачей* / И. В. Раковская. М., 1999. С. 32–33.
3. *Hardy diagnostics. SP4 media. Instructions for use.* [www.HardyDiagnostics.com](http://www.HardyDiagnostics.com).

***Rudenkova T. V., Kostiuk S. A., Rubanik L. V.***

### **The results of the use of the developed environment for cultivation and identification of *Mycoplasma genitalium***

*Mycoplasma genitalium* is difficultly cultivated microorganism. Worked out growth medium for *M. genitalium* cultivation and revealing application makes possible to find out presence of the aetiological agent in biological material, and allows to obtain pure *M. genitalium* cultures, without others genital mycoplasmas inclusion.