

Определение концентрации ДНК мико- и уреоплазм у беременных при инфекциях родовых путей методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (real-time PCR)

Г. Я. Хулуп, С. А. Костюк, Н. А. Бадыгина, М. А. Исмаил

Белорусская медицинская академия последипломного образования

Центральная научно-исследовательская лаборатория, Минск, Республика Беларусь

DNA mycoplasmas and ureaplasmas concentration detection in pregnant patients with infections of the birth canal by Real-Time Polymerase Chain Reaction method

G. Ya. Khulup, S. A. Kostiuk, N. A. Badigina, M. A. Ismail

Byelorussian Medical Academy of Post Graduate Education

Central Research Laboratory, Minsk, Republic of Belarus

Аннотация

Целью работы явилось установить диагностически значимые концентрации ДНК мико- и уреоплазм при инфекциях родовых путей у беременных с клиническими признаками урогенитальных инфекций, используя метод ПЦР в режиме реального времени. Исследования проводились в группе беременных с инфекциями родовых путей. В соскобах эпителиальных клеток из уретры и цервикального канала количественно определяли ДНК *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*. Установлено, что диагностически значимой концентрацией ДНК 16S рРНК *Mycoplasma hominis* является $3,6 \times 10^4$ до $2,25 \times 10^3$ копий/мл, для ДНК 16S рРНК *Ureaplasma urealyticum* является от $1,5 \times 10^4$ до 469 копий/мл. При изучении взаимосвязи концентраций ДНК возбудителей с наличием у беременных клиническими признаками урогенитальных инфекций была выявлена статистически значимая корреляция с тяжестью течения урогенитальной инфекции ($p < 0,05$), выраженностью клинических проявлений ($p < 0,05$) и наличием осложнений течения беременности у женщин ($p < 0,05$).

Ключевые слова

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, мико- и уреоплазмы, инфекция родовых путей у беременных.

Проблема инфекции родовых путей у беременных принадлежит к числу важнейших вопросов акушерства. Инфекционные заболевания, возникающие во время беременности женщин, обуславливают инфицирование родовых путей и плода, что приводит к ранней детской смертности и возникновению пороков развития, поэтому необходимо проведение целенап-

Summary

The goal of the research: To find a diagnostically important DNA mycoplasmas and ureaplasmas concentration using the real-time PCR method in a group of pregnant women with infections of the birth canal with the presence of clinical signs of urogenital infections. The research was held in a group of pregnant women with infections of the birth canal. DNA *Mycoplasmas hominis* and *Ureaplasmas urealyticum* were quantitatively determined from scrapes of epithelial cells taken from the urethra and the cervical canal. It was determined that the diagnostically important concentration of DNA 16S rRNA *Mycoplasma hominis* is from 3.6×10^4 to 2.25×10^3 copies/ml; diagnostically important concentration of DNA 16S rRNA *Ureaplasma urealyticum* is from 1.5×10^4 to 469 copies/ml. When studying the DNA pathogens correlation with signs of urogenital infections it was discovered that a statistically important correlation with the severity of the urogenital infections course ($p < 0.05$), the intensity of clinical presentations ($p < 0.05$) and the presence of complications of the pregnancy course ($p < 0.05$) (in the group of pregnant women).

Keywords

Real-time polymerase chain reaction, mycoplasma and ureaplasma, the birth canal infections.

равленной диагностики для выявления инфекционных процессов у беременных женщин [1, 2, 3].

Наиболее частой причиной развития патологии течения беременности, родов являются различные инфекции, в том числе следующие: герпетическая, хламидийная, микоплазменная, цитомегаловирусная и их сочетания, передающиеся главным образом половым

путём, а также некоторыми онкогенными вирусными инфекциями [3, 4].

Многие авторы связывают неблагоприятное течение беременности, приводящее к спонтанным абортam или преждевременным родам с инфицированностью урогенитального тракта женщин *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* [5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12].

Отсутствие специфической клиники урогенитальных инфекций часто маскирует эти заболевания другими диагнозами, что не позволяет своевременно начать адекватную этиотропную терапию и способствует быстрому распространению инфекций передающихся половым путем в популяции [4, 13].

Наиболее чувствительным и специфическим методом клинической лабораторной диагностики возбудителей инфекционных заболеваний является полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющая выявлять ДНК возбудителя непосредственно в биологическом материале [14, 15, 16, 17, 18]. Новой методикой в молекулярной биологии является полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени (Real-Time PCR) которая позволяет проводить количественное измерение нуклеиновых кислот инфекционных агентов в биологической пробе [16, 19, 20, 21, 22].

Сущность метода заключается в регистрации накопления продуктов реакции в реальном времени и построении калибровочных кривых по реальным процессам, происходящим в каждой конкретной анализируемой пробе. Кинетика накопления продуктов амплификации связана с исходным количеством матрицы, что дает возможность точно оценить ее количество. Интенсивность сигнала пропорциональна концентрации конечного продукта [16, 19].

Цель исследования — установить диагностически значимые концентрации ДНК мико- и уреоплазм при инфекциях родовых путей у беременных с клиническими признаками урогенитальных инфекций, используя метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Материалы и методы

Исследования проводились в группе беременных с клиническими проявлениями инфекции родовых путей. Средний возраст обследуемых был 30 ± 5 лет. В качестве материала для исследования у беременных использовались соскобы эпителиальных клеток из уретры и цервикального канала.

Весь технологический процесс ПЦР исследования осуществлялся в трех основных процедурах: пробоподготовки клинических образцов; проведения самой полимеразной реакции, направленной на умножение (амплификация) фрагментов ДНК биологического возбудителя заболеваний, и детекция продукта ПЦР, т.е. оценка результата.

В каждом клиническом образце традиционным методом ПЦР качественно определяли наличие ДНК *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*, используя диагностические наборы «Полимик», «Амплисенс», «Амплисенс Flu» для ПЦР в реальном времени (НПФ «Литех» НИИ физико-химической медицины МЗ РФ,

НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ РФ, г. Москва). Из соскобов эпителиальных клеток ДНК выделялись сорбционным методом: адсорции на частицах двуокиси кремния в присутствии гуанидинатицианата натрия, отмывая этиловым спиртом. Амплификацию ДНК проводили в многоканальном амплификаторе «Терцик МС2». Для оценки результатов использовали трансиллюминатор Н-2 («Петротерм», Россия) с длиной волны 310 нм с применением видеосистемы для регистрации гелей «Gel-Imager» («Петротерм», Россия) с помощью программы «Gel Explorer» версия 1,0. Анализ результатов проводился по внутренним контролям и контрольным образцам, а также по количеству синтезированных пар нуклеотидов, молекулярной массе и интенсивности свечения фрагмента молекулы ДНК.

Для проведения количественного определения ДНК *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* методом ПЦР в реальном времени исследования проводились с образцах ДНК-позитивных по данным видам инфекционных возбудителей.

На первом этапе проводилась подготовка пробирок с ПЦР-смесью-1, содержащей специфические праймеры и нуклеотиды, раскапанные под воск. Размораживали пробирку с ПЦР-смесью-3 (флуоресцентная метка) и тщательно перемешивали содержимое. Готовили верхнюю ПЦР-смесь из расчета 7 мкл ПЦР-смеси-2 (буфер и Tag-полимеразы) на одну реакцию. В пробирки с ПЦР-смесью-1 на поверхность застывшего воска раскапывали по 10 мкл верхней ПЦР-смеси, которая не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1. В готовые таким образом пробирки вносили по 10 мкл ДНК-проб, выделенных из клинических и контрольных биологических проб. Ставили контрольные реакции амплификации: для отрицательного контроля вместо ДНК-пробы вносили 10 мкл ДНК-буфера, а для положительного контроля вносили 10 мкл ДНК-стандарта. Пробирки помещали в ячейки ротора термоциклера «Rotor-Gene-3000» («Corbet research», Австралия).

Детекция амплифицированной ДНК с проводилась с использованием интеркалирующего красителя-Sybr-Green I (SG), основанная на том, что флуоресцентный сигнал от SG сравнительно низкий в его свободном состоянии, однако сигнал значительно увеличивался, когда SG встраивается в двух цепочечную молекулу ДНК.

Результаты и обсуждение

Для детекции SG флуоресценции использовали FAM/Sybr (470/510 nm) канал. Флуоресцентный сигнал увеличивался пропорционально с увеличением количества ампликона произведенного в каждом амплификационном цикле и использовался для количественного определения ДНК. Так как Sybr-Green I не является специфическим красителем и встраивается в любую двух цепочечную молекулу ДНК, учет результатов ПЦР проводился по анализу кривых плавления.

Положительные клинические образцы и положительные контроли имели на графике пики, поло-

жение которых (температура плавления) зависело от используемых тест-систем и результатов прохождения ПЦР (таблица 1)

Отсутствие исследуемой ДНК приводило к отсутствию пиков плавления. При наличии неспецифических продуктов амплификации, праймеров-димеров и т.д. наблюдались пики с другой температурой плавления, отличающейся от температуры плавления специфических ампликонов.

ческом материале высчитывалось автоматически по формуле: концентрация = $10^{(-0,261 \cdot CT + 11,870)}$ (Рис.1).

Установлено методом ПЦР в режиме реального времени, что диагностически значимой концентрацией ДНК 16S рРНК *Mycoplasma hominis* является $3,6 \times 10^4$ до $2,25 \times 10^3$ копий/мл, для ДНК 16S рРНК *Ureaplasma urealyticum* является от $1,5 \times 10^4$ до 469 копий/мл.

Таблица 1.
Температура плавления ДНК для выявления *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*

№ п\п	Наименование возбудителя	Диапазон, °С
1	<i>Mycoplasma hominis</i>	86–88
2	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	78,5–81

Для построения стандартной кривой была проведена амплификация 2-кратного титрования ДНК-стандарта 16S рРНК *Mycoplasma hominis* в диапазоне от $3,6 \times 10^4$ до $2,25 \times 10^3$ копий/мл и количественно проанализирована в соответствии с рисунком 1.

Каждая из ДНК концентраций амплифицирована была проамплифицирована в дублях вместе с двумя «NTC». NTC реактив состоял из сложной ДНК амплификационной смеси, где мишень ДНК-стандарта заменена водой.

Корреляции между СТ (значение цикла при котором пороговая линия и кривая амплификации пересекается) и \log_{10} концентрации копий 16S рРНК *Mycoplasma hominis* в мл составила $R^2 > 0,98$. Значение концентрации *Mycoplasma hominis* в биологи-

Для построения стандартной кривой была проведена амплификация 2-кратного титрования ДНК-стандарта 16S рРНК *Ureaplasma urealyticum* в диапазоне от $1,5 \times 10^4$ до 469 копий/мл и количественно проанализирована.

Каждая из ДНК концентраций амплифицирована была проамплифицирована в дублях вместе с двумя «NTC». NTC реактив состоял из сложной ДНК амплификационной смеси, где мишень ДНК-стандарта заменена водой.

Корреляции между СТ (значение цикла при котором пороговая линия и кривая амплификации пересекается) и \log_{10} концентрации копий ДНК 16S рРНК *Ureaplasma urealyticum* в мл составила $R^2 > 0,98$ в соответствии с рисунками 2, 3.

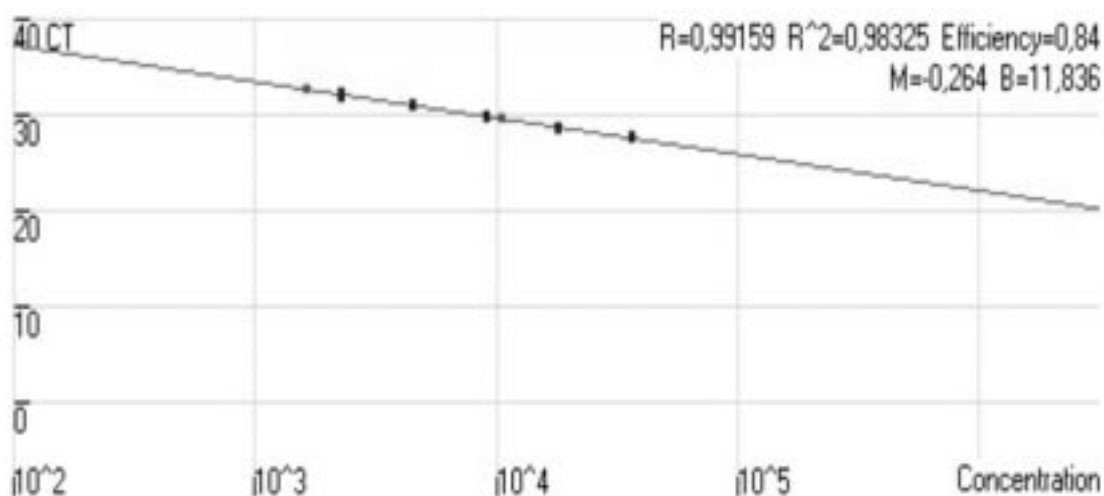


Рис. 1. Стандартная кривая корреляции между СТ \log_{10} концентраций копий ДНК-стандарта 16S рРНК *Mycoplasma hominis*. Начальная концентрация ДНК-стандарта в диапазоне от $3,6 \times 10^4$ до $2,25 \times 10^3$ копий/мл.

Значение концентрации *Ureaplasma urealyticum* в биологическом материале высчитывалось автоматически по формуле: концентрация = $10^{(-0,227 \cdot CT + 10,827)}$.

Установлено, что диагностически значимой концентрацией ДНК 16S рРНК *Mycoplasma hominis* является $3,6 \times 10^4$ до $2,25 \times 10^3$ копий/мл.

При изучении взаимосвязи количества копий ДНК возбудителей с наличием у беременных клиническими признаками урогенитальных инфекций, с патологией течения беременности была выявлена статистически значимая корреляция с тяжестью течения урогенитальной инфекции ($p < 0,05$), выраженностью клинических проявлений ($p < 0,05$) и наличием осложнений течения беременности у женщин ($p < 0,05$).

Определено, что при наличии острого воспалительного процесса урогенитального тракта у беременных женщин концентрация ДНК 16S рРНК *Mycoplasma hominis* превышает диагностически значимую в 10–1000 раз, что является показателем активности воспалительного процесса и может служить одним из показателей прогноза течения заболевания и фактором развития осложнений беременности, а также критерием инфицирования плода и новорожденного ребенка.

При ассоциациях *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* концентрация ДНК 16S рРНК *Ureaplasma urealyticum* превышал пороговое значение в 10–100 раз, что свидетельствует об усилении патологического (болезнетворного) действия, т.е. суммации повреждающего эффекта этих возбудителей при наличии микст-инфекции урогенитального тракта. Достоверность различия результатов концентрации ДНК 16S рРНК в группе с уреоплазменной инфекцией в сравнении с группой с микоуреоплазменной инфекцией составляет 95%

При проведении ПЦР-исследований в группе беременных ($n=30$) на разных сроках гестации с осложнениями течения беременности (угроза невынашивания, ОАА, цервицит, кольпит, пиелонефрит) сочетание *Ureaplasma urealyticum* с *Mycoplasma hominis* отмечено в 53% случаев.

При проведении количественного определения ДНК *Ureaplasma urealyticum* в группе с моно-уреоплазменной инфекцией и в группе с выявленной мико-уреоплазменной инфекцией показано, что концентрация ДНК *Ureaplasma urealyticum* в образцах в группе с моноинфекцией достоверно ниже ($p < 0,05$), чем в группе с микоуреоплазменной инфекцией (таблица 2).

Таблица 2
Концентрация ДНК *Ureaplasma urealyticum* в группах с микоуреоплазменной и моноинфекцией

№ п/п	Группы обследованных	Концентрация ДНК <i>Ureaplasma urealyticum</i> (копий/мл)
1	Микоуреоплазменная инфекция (n=19)	97056±31580
2	Уреоплазменная инфекция (n=18)	11850±4304*

Ἰδέειν ἀτέλῃ: ἀνὸ τὰ ἀδύτην διὰ τὴν ἐξέλιξιν ἢ ἀπὸ τῆς ἐξέλιξιν ἢ ἀπὸ τῆς ἐξέλιξιν ἀπὸ τῆς ἐξέλιξιν
*ἐπὶ τῆς ἐξέλιξιν * - $p < 0,05$*

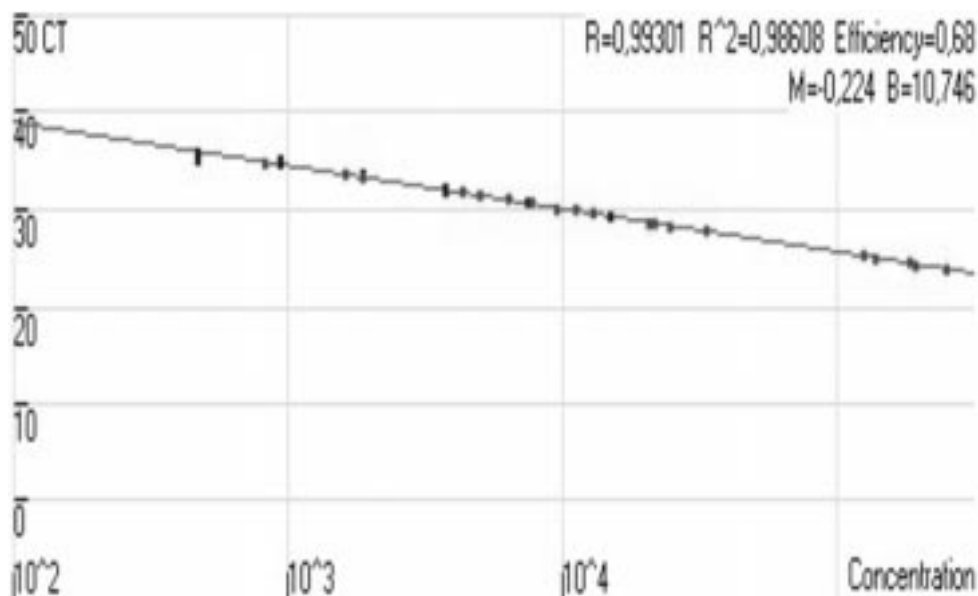


Рис. 2. Стандартная кривая корреляции между CT log10 концентраций копий ДНК 16S рРНК *Ureaplasma urealyticum* и ДНК *Ureaplasma urealyticum* биологических проб.

Таким образом, установлено, что диагностически значимой концентрацией ДНК 16S рРНК *Ureaplasma urealyticum* является от $1,5 \times 10^4$ до 469 копий/мл. Определено, что при наличии воспалительного процесса урогенитального тракта у беременных женщин с моноинфекцией концентрация ДНК 16S рРНК *Ureaplasma urealyticum* не превышает диагностически значимую. В то же время при ассоциациях *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* концентрация ДНК 16S рРНК *Ureaplasma urealyticum* превышает пороговое значение в 10–100 раз, что свидетельствует об усилении патологического (болезнетворного) действия, т.е. суммации повреждающего эффекта этих возбудителей при наличии микст-инфекции урогенитального тракта. Достоверность различия результатов концентрации ДНК 16S рРНК в группе с уреаплазменной инфекцией в сравнении с группой с микоуреаплазменной инфекцией составляет 95%.

При количественном определении уровня микоплазменной нагрузки у 23 беременных на разных сроках гестации с осложнениями беременности микоплазменная нагрузка каждого образца была от $5,4 \times 10^4$ до $2,7 \times 10^7$ копий/мл. Две пациентки с наименьшей микоплазменной нагрузкой $5,4 \times 10^4$ и $8,0 \times 10^4$ копий/мл в сроке гестации 12 и 35 недель, соответственно, находилась в стационаре по поводу сохранения беременности и в анамнезе имели эрозию шейки матки. У четырех пациенток с угрозой преждевременных родов и с клиническими проявлениями урогенитальных инфекций (кольпит, цервицит) микоплазменная нагрузка составляла от $1,0 \times 10^5$ до $7,0 \times 10^5$ копий/мл. Одна из пациенток с концентрацией ДНК 16S рРНК *Mycoplasma hominis* $6,3 \times 10^5$ копий/мл в образце имела в анамнезе пиелонефрит. У трех женщин в послеродовом периоде, дети которых имели диагноз внутриутробное инфицирование, микоплазменная нагрузка составляла $3,4 \times 10^5$, 4×10^6 и $3,4 \times 10^7$ копий/мл. При обследовании беременной на 17 неделе гестации с сепсисом и ДВС синдромом микоплазменная нагрузка была достаточно высока $2,7 \times 10^7$ копий/мл.

Литература

1. Арестова И.М., Занько С.Н., Русакевич П.С. Генитальные инфекции и беременность. Москва: 2003.
2. Барановская Е.И., Жаворонок С.В. Медицинские и социальные аспекты хламидийной инфекции. Медицинские новости. 2001; №7: 8–9.
3. Барановская Е.И., Жаворонок С.В., Шишко Г.А. Герпесвирусные инфекции в патологии беременности, плода и новорожденного. Здравоохранение 2001; №8: 36–39.
4. Козлова В.И., Пухнер А.Ф. Вирусные, хламидийные и микоплазменные заболевания гениталий. С.-Петербург: 2000.
5. Abele-Horn M., Schoiz M., Wolff C., Kolben M. High-density vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization as a risk factor for chorioamnionitis and preterm delivery. Acta

Таким образом, выявлено, что при сочетанном инфицировании *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* наблюдается активизация воспалительного процесса урогенитального тракта, усиление тяжести течения заболевания, развитие осложнений беременности и увеличение риска развития инфицирования плода и новорожденного ребенка, что расширяет имеющиеся представления о патогенетических аспектах мочеполовых инфекций, патологии течения беременности и роли *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* в развитии урогенитальных заболеваний.

Выводы

1. Количественно с помощью ПЦР в режиме реального времени (Real-Time PCR) установлены уровни микоплазменной нагрузки при инфекциях родовых путей у беременных женщин с клиническими признаками урогенитальных инфекций.
2. Установлено, что при наличии острого воспалительного процесса урогенитального тракта у беременных женщин концентрация ДНК 16S рРНК *Mycoplasma hominis* превышает диагностически значимую в 10–1000 раз, что является показателем активности воспалительного процесса и может служить одним из показателей прогноза течения заболевания и фактором развития осложнений беременности, а также критерием инфицирования плода и новорожденного ребенка.
3. Определено, что при наличии воспалительного процесса урогенитального тракта у беременных женщин с моноинфекцией концентрация ДНК 16S рРНК *Ureaplasma urealyticum* не превышает диагностически значимую концентрацию.
4. Выявлено, что при ассоциациях *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* концентрацией ДНК 16S рРНК *Ureaplasma urealyticum* превышает пороговое значение в 10–100 раз, что свидетельствует об усилении патологического (болезнетворного) действия, т.е. суммации повреждающего эффекта этих возбудителей при наличии микст-инфекции урогенитального тракта.

Obstet Gynecol Scand 2000; №19(11): 973–978.

6. Acosta B., Morcillo F., Viudes A., Gasco B. et al. Neonatal colonization by *Ureaplasma urealyticum* and the development of bronchopulmonary dysplasia. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1999; №17 (10): 493–497.

7. Agarwal P., Rajadurai VS., Pradeepkumar VK., Tan KW.. *Ureaplasma urealyticum* and its association with chronic lung disease in Asian neonates. J. Paediatr Child Health.-2000; №36(5): 487–490.

8. Calleri LF., Taccani C., Porcelli A. *Ureaplasma urealyticum* vaginosis and premature rupture of membranes. What is its role? Minerva Ginecol.2000; №52(3): 49–58.

9. Christine L.Knox and Peter Timms. Comparison of PCR, Nested PCR, and Random Amplified Polymorphic DNA PCR for Detection and Typing of *Ureaplasma urealyticum* in

Specimens from Pregnant Women. *Jornal of Clinical Microbiology* 1998; Vol. 36; №10: 3032–3039.

10. Donders GG., Van Bulck B., Caudron J. et al. Relationship of bacterial vaginosis and micoplasmas to the risk of spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; №183(2): 431–437.

11. Galetto Lacour A., Zamora S., Bertrand R., Brighi Perret L., Auckenthaler R., Bener M., Suter S. Colonization by *Ureaplasma urealyticum* and chronic lung disease in premature newborn infant under 32 weeks of gestation. *Arch. Pediatr.* 2001; №8(1): 39–46.

12. Ye Y., Tu S., Li H. Clinic intervention study on urogenital *Mycoplasma* infection of pregnant women. *Zhonghua Liu Xing Bing Xul Zhi.* 2001; №22(4): 293–295.

13. Прозоровский С.В., Раковская И.В., Вульфович Ю.В. Медицинская микоплазмология. М.; 1995.

14. Гинцбург А.Л. Современное состояние и перспективы молекулярно-генетических методов в решении задач медицинской микробиологии. *Микробиология, иммунология и вирусология.* 1999; №5: 22–26.

15. Лопухов Л.В., Эйдельштейн Н.В. ПЦР в клинической микробиологической практике. *Клиническая мик-*

робиология и антимикробная химиотерапия. 2000; Т.2; №3: 96–106.

16. Олецкий Э.И., Таганович А.Д. Современные методы молекулярной биологии и их прикладное значение. М.: Мед. книга; 1999.

17. Саики Р., Гиленстен У., Эрлих Г. Полимеразная цепная реакция. Анализ генома. Методы. М.: Мир; 1990: 176–190.

18. Херрингтон Н.Г. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. М.: Мед. книга, 1999.

19. Екимов А. Н., Шипулин Г. А., Бочкарев Е. Г., Рюмин Д. В. Новейшие технологии в генодиагностике: полимеразная цепная реакция в реальном времени (REAL-TIME PCR) *Вестник последиplomного медицинского образования* 2002; №3: 7–10.

20. Kim DW. Real-time quantitative PCR. *Exp. Mol. Med.* 2000; Vol. 21; №31: 101–109..

21. Mackay Ian M. et al. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research.* 2002; Vol. 30; №6: 1292–1305.

22. Walker NJ. Real-time and quantitative PCR: applications to mechanism-based toxicology. *J Biochem. Mol. Toxicol.* 2001; Vol.15; № 3: 121–127.