

Генетические варианты *U. parvum* и их роль в развитии воспалительных заболеваний мочеполовой системы

М.Р. Рахматулина, К.И. Плахова, О.Н. Игонина

ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России
107076, Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6

Изучена частота выявления различных генетических вариантов *U. parvum* у женщин с воспалительными заболеваниями мочеполовой системы и у клинически здоровых лиц. Проведено молекулярное типирование *U. parvum* по гену *mba* 40 образцов, полученных от женщин с различным клиническим течением воспалительных заболеваний мочеполовой системы. Показано наличие ассоциации между клиническими проявлениями воспалительных заболеваний мочеполовой системы, вызванных *U. parvum* и различными сероварами *U. parvum*. Инфицирование сероваром 6 *U. parvum* чаще, чем инфицирование другими исследованными сероварами (1 и 3), приводит к развитию воспалительного процесса в виде цервицита или вагинита, сопровождающегося субъективными проявлениями ($p < 0,05$).

Ключевые слова: **ген *mba U. parvum*, серовары *U. parvum*, молекулярное типирование.**

Контактная информация: plahova_xenia@mail.ru. Вестник дерматологии и венерологии 2014; (3): 79—84.

Genetic variants of *U. parvum* and their role in the development of inflammatory diseases of the urogenital system

M.R. Rakhmatullina, K.I. Plakhova, O.N. Igonina

State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Ministry of healthcare of the Russian Federation
Korolenko str., 3, bldg 6, Moscow, 107076, Russia

The article discusses the results of a study aimed at determining the frequency of different genetic variants of *U. parvum* in women with inflammatory diseases of the urogenital system and clinically healthy subjects. Molecular typing of 40 samples of *U. parvum* taken from women with different forms of inflammatory diseases of the urogenital system was performed for the *mba* gene. The authors revealed a relationship between clinical manifestations of inflammatory diseases of the urogenital system caused by *U. parvum* and different *U. parvum* serovars. An infection with 6 *U. parvum* serovar results in the development of inflammatory processes in the form of cervicitis or vaginitis accompanied by subjective manifestations more frequently than an infection with other serovars under examination (1 and 3) ($p < 0.05$).

Key words: ***mba U. parvum* gene, *U. parvum*, serovars, molecular typing.**

Corresponding author: plahova_xenia@mail.ru. Vestnik Dermatologii i Venerologii 2014; 3: 79—84.

■ В последние годы изучению роли представителей рода *Ureaplasma* в патогенезе воспалительных заболеваний урогенитального тракта посвящены исследования, основанные на анализе клинических и лабораторных данных обследования больных, в том числе с применением молекулярно-генетических методов. По современным данным, представители рода *Ureaplasma* являются условно-патогенными микроорганизмами и могут быть идентифицированы у клинически здоровых лиц [1, 2]. В то же время уреоплазмы способны вызывать воспалительные заболевания мочеполового тракта, преимущественно цервицит, уретрит и вагинит [3].

Существенные различия, обнаруженные исследователями в генах уреазы, многополосного мембранного антигена (МБА), 16S рПНК и 16S—23S рПНК спейсерной области двух биоваров *Ureaplasma*, позволили дифференцировать их как различные разновидности: биовар 1 — *U. parvum* (включает серотипы 1, 3, 6 и 14) и биовар 2 — *U. urealyticum* (включает серотипы 2, 4, 5 и 7—13).

В 2000 г. геном *Ureaplasma spp.* был полностью секвенирован и установлено, что он отличается пластичностью, обладает хорошими адаптивными свойствами, а его размер составляет 751 bp. По данным ученых, генетический материал *Ureaplasma spp.* содержит 613 ОРС (открытых рамок считывания) и 39 генов, кодирующих РНК. При этом гены занимают 93% всего объема генетической информации, и предположительно около 28% из них являются уникальными, не имеющими аналогов среди представителей других видов микроорганизмов [4—6].

Размер генетического материала *Ureaplasma spp.* может меняться не только внутри одного рода, вида, но и в пределах штамма, что связано с высокой частотой мутаций [7]. Исследования показали, что один из генов *Ureaplasma spp.* — ген *mba* (*multiple-banded antigen*), продуктом синтеза которого является мембранный белок МБА, обладает выраженными антигенными свойствами. Ген *mba* имеет нестабильную и вариабельную структуру, состоит из относительно консервативного 5'-отрезка и переменной 3'-области, содержащей однородные повторяющиеся элементы, что определяет патогенный потенциал и обуславливает высокую изменчивость генетических и фенотипических свойств *Ureaplasma spp.* Уклонению от иммунного ответа и длительному латентному существованию микроорганизма способствует антигенное разнообразие белка МБА, которое обеспечивается изменением числа повторяющихся звеньев в структуре переменной области. Известно, что именно 3'-область гена *mba* может быть различной в пределах одного штамма [7—10], в связи с чем на современном этапе внимание исследователей направлено на изучение относительно стабильного 5'-отрезка гена *mba*, кодирующего сигнальный пептид [11].

Важнейшим компонентом разработки способов прогнозирования клинического течения инфекционного процесса является получение данных о свойствах микроорганизма, в первую очередь генетических. Приоритетным направлением исследований в данной области представляется изучение регуляторных механизмов работы генов, кодирующих ключевые белки, отвечающие за вирулентность бактерий. Генетическая вариабельность 5'-отрезка гена *mba U. parvum* может обуславливать различное клиническое течение воспалительных заболеваний мочеполовой системы, однако клиническое значение отдельных генотипов до настоящего времени изучено недостаточно.

Цель исследования: изучить частоту выявления различных генетических вариантов *U. parvum* у женщин с воспалительными заболеваниями мочеполовой системы и у клинически здоровых лиц.

Материал и методы

В исследование было включено 115 женщин в возрасте от 20 до 40 лет. Идентификация *Ureaplasma spp.* осуществлялась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и культуральным методом (DUO, Biorad). Критерием включения в исследование являлась идентификация *U. parvum* при лабораторном исследовании биологического материала, полученного из уретры, цервикального канала и заднего свода влагалища обследованных женщин. Критерием исключения из исследования являлась идентификация возбудителей инфекций, передаваемых половым путем, культуральным методом и/или методом ПЦР: *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis*, *M. genitalium*, вирус простого герпеса, а также условно-патогенных микроорганизмов, в том числе *U. urealyticum*.

Все пациентки были разделены на две группы: 1-ю группу составили 70 женщин с воспалительными заболеваниями мочеполовой системы (уретрит, вагинит, цервицит), 2-ю группу — 45 женщин, не имевших клинических и лабораторных признаков воспалительного процесса мочеполовой системы и обратившихся для проведения профилактического обследования.

Оценка выраженности лейкоцитарной реакции проводилась при микроскопическом исследовании биологического материала. Критериями уретрита и цервицита являлось обнаружение 10 и более полиморфно-ядерных лейкоцитов в поле зрения в отделяемом уретры и цервикального канала соответственно при просмотре более 5 полей зрения при увеличении светового микроскопа ×1000. Диагноз цервицит устанавливался при наличии лейкоцитоза и слизистогнойных выделений из цервикального канала. Диагностическим критерием вагинита являлось изменение соотношения полиморфно-ядерных лейкоцитов и клеток плоского эпителия более чем 1:1.

Для проведения молекулярного типирования по гену *mba* отобрано 90 образцов *U. parvum*, полученных от 45 женщин 1-й группы и 45 женщин 2-й группы.

Изучение генетической вариабельности *U. parvum* (гена *mba*) осуществлялось методом секвенирования с использованием генетического анализатора 3130 Genetic Analyzer с последующим анализом нуклеотидных последовательностей гена с помощью компьютерной программы MEGA5.

Амплификация вариабельного участка гена *mba* осуществлялась с использованием праймеров, представленных в табл. 1.

Результаты исследования

Средний возраст пациенток, включенных в исследование, составил 23,3 года, при этом группы были сопоставимы по возрастному составу.

Основными субъективными проявлениями воспалительного процесса мочеполовой системы у пациенток 1-й группы являлись: патологические выделения из половых путей — у 48 (68,6%), зуд в области наружных половых органов — у 10 (14,3%), учащенное мочеиспускание — у 7 (10,0%), боль внизу живота — у 7 (10,0%), жжение в области наружных половых органов — у 6 (8,6%), болезненность при половом акте — у 3 (4,3%).

При обращении за медицинской помощью 50 (43,5%) женщин (5 пациенток 1-й группы и 45 пациенток 2-й группы) не предъявляли жалоб со стороны мочеполовой системы. При этом у пациенток 1-й группы наблюдались объективные признаки воспалительного процесса мочеполовой системы, подтвержденные результатами лабораторных исследований.

По данным объективного обследования пациенток 1-й группы были установлены следующие патологические изменения: гиперемия и отечность слизистой оболочки шейки матки — у 42 (70,0%), патологические выделения из цервикального канала — у 39 (55,7%), слизисто-гнойные выделения в заднем своде влагалища — у 16 (22,9%), гиперемия слизистой оболочки влагалища — у 15 (21,4%), гиперемия слизистой оболочки вульвы — у 5 (7,1%).

По данным объективного обследования пациенток 2-й группы патологических изменений не выявлено.

Согласно результатам микроскопического исследования у 59 (84,3%) пациенток 1-й группы наблюдалось повышенное содержание лейкоцитов в биологическом материале, полученном из цервикального канала (от 10 до 100 полиморфно-ядерных лейкоцитов в поле зрения); у 14 (20,0%) — в биологическом матери-

але, полученном из уретры (от 10 до 15 полиморфно-ядерных лейкоцитов в поле зрения), у 12 (17,1%) пациенток — в биологическом материале, полученном из заднего свода влагалища, при этом выявлялось изменение соотношения полиморфно-ядерных лейкоцитов и клеток плоского эпителия влагалища более чем 1:1.

При микроскопическом исследовании биологического материала, полученного у пациенток 2-й группы, выявлены показатели, соответствующие норме.

Таким образом, клинико-лабораторные признаки воспалительных заболеваний мочеполового тракта были выявлены у 70 (60,9%) пациенток, инфицированных *U. parvum*, из них у 14 (20,0%) женщин по результатам клинико-лабораторного обследования был диагностирован уретрит, у 39 (55,7%) — цервицит и у 12 (17,1%) — вагинит. У 5 (7,1%) пациенток была выявлена сочетанная локализация воспалительного процесса (цервицит с уретритом и/или вагинитом) (рис. 1).

С целью изучения взаимосвязи клинического течения инфекционного процесса с молекулярно-генетическими особенностями микроорганизма проведено молекулярное типирование 90 образцов *U. parvum* по гену *mba*, из них 45 образцов были получены от пациенток 1-й группы и 45 образцов — от пациенток 2-й группы.

Секвенирование и анализ последовательностей гена *mba U. parvum* 5'-участок позволили провести распределение исследуемых генотипов *U. parvum* по трем сероварам ($n = 90$):

- серовар 3 (35 образцов) совпадает с референсной последовательностью гена *mba U. parvum* (ATCC 700970);
- серовар 6 (32 образца) — 41 (N→S), 44 (A→V), 49 (G→D), 66 (N→D), 67 (D→N), 73 (S→N), 74 (N→D);
- серовар 1 (21 образец) — 49 (G→D), 66 (N→D), 67 (D→N), 73 (S→N), 74 (N→D).

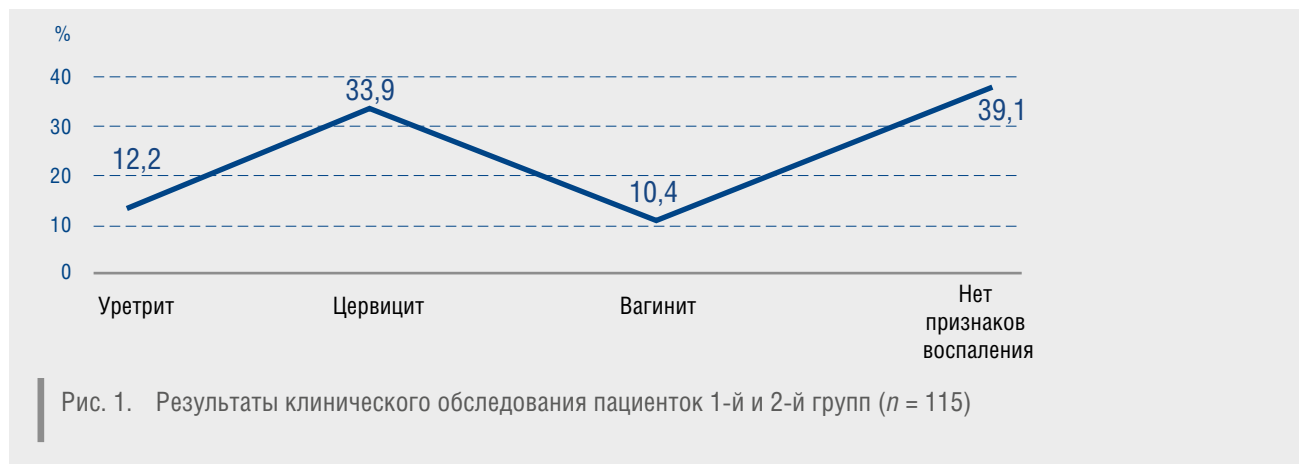
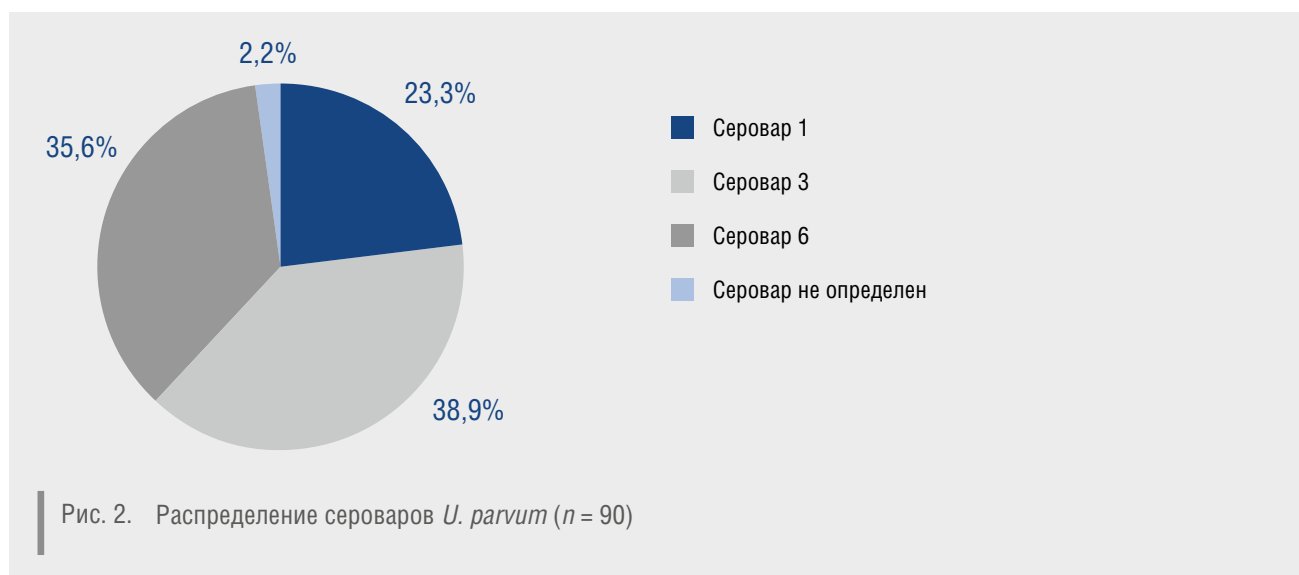
Кроме того, были идентифицированы два образца, генетические варианты которых не соответствовали ни одному из ранее известных сероваров. В нуклеотидной последовательности этих образцов были обнаружены мутации, приводящие к аминокислотным заменам в N-концевом участке белка MBA в 42 (Q→E), 44 (A→V), 49 (G→D), 66 (N→D), 67 (D→N), 73 (S→N), 74 (N→D) положениях (рис. 2).

В результате изучения генетических вариантов *U. parvum* получено следующее распределение сероваров. Серовар 6 достоверно чаще регистрировался

Таблица 1

Последовательность праймеров, использованных для амплификации вариабельного участка гена *mba U. parvum*

Праймер	Нуклеотидная последовательность	Условия амплификации
<i>mba</i> For	TCTGAGCTATGACATTAGGTGT	95 °C — 10 с.
<i>mba</i> Rev	AGTTTCTTTACCTGCTGTTGT	64 °C — 10 с.

Рис. 1. Результаты клинического обследования пациенток 1-й и 2-й групп ($n = 115$)Рис. 2. Распределение сероваров *U. parvum* ($n = 90$)

у женщин с воспалительными заболеваниями урогенитальной системы, чем у клинически здоровых лиц — у 22 (48,9%) и 10 (22,2%) обследованных соответственно ($p < 0,05$).

Серовар 3, напротив, был идентифицирован у большинства женщин без клинико-лабораторных признаков инфекционного процесса — у 24 (53,3%) обследованных и достоверно реже выявлялся у пациенток с воспалительными заболеваниями мочеполовой системы — у 11 (24,4%) обследованных ($p < 0,05$).

Серовар 1 регистрировался с близкой по значению частотой среди пациенток 1-й и 2-й групп: у 10 (22,2%) и 11 (24,4%) соответственно ($p \geq 0,05$). Образцы *U. parvum*, генетические варианты которых не относились ни к одному из известных сероваров, были получены от пациенток 1-й группы.

При сопоставлении результатов клинико-лабораторного обследования пациенток и молекулярно-

биологических исследований продемонстрировано, что у 21 (65,6%) пациентки, инфицированной сероваром 6 *U. parvum*, были установлены клинико-лабораторные признаки цервицита, у 4 (12,5%) — уретрита, у 5 (14,6%) — вагинита. Субъективные симптомы воспалительного процесса были зарегистрированы у 19 (59,4%) пациенток.

У 10 (28,5%) пациенток, инфицированных сероваром 3 *U. parvum*, установлены клинико-лабораторные признаки цервицита, у 6 (17,1%) пациенток — уретрита, у 5 (14,3%) — вагинита. При этом жалобы со стороны мочеполовой системы предъявляли 10 (28,5%) пациенток.

У 8 (38,0%) пациенток, инфицированных сероваром 1 *U. parvum*, был диагностирован цервицит, у 4 (19,0%) — уретрит, у 2 (9,5%) — вагинит. При этом у 9 (42,9%) пациенток воспалительные заболевания сопровождались субъективными симптомами.

Таблица 2

 Клинические проявления воспалительных процессов мочеполовой системы у женщин, инфицированных различными сероварами *U. Parvum*, абс. (%)

Серовары <i>U. parvum</i>	Диагноз (результат клинико-лабораторного обследования)			Клинико-лабораторные признаки воспаления отсутствуют
	цервицит	уретрит	вагинит	
Серовар 1 (<i>n</i> = 21)	8 (38,0)	4 (19,0)	2 (9,5)	11 (52,4)
Серовар 3 (<i>n</i> = 35)	10 (28,5)	6 (17,1)	5 (14,3)	24 (68,6)
Серовар 6 (<i>n</i> = 32)	21 (65,6)*	4 (12,5)	5 (14,6)	10 (31,3)*

Примечание. * $p < 0,05$ (серовар 3 / серовар 6); во всех остальных случаях различия недостоверны.

У пациенток, инфицированных *U. parvum*, не относящимися к известным сероварам, по результатам клинико-лабораторного обследования одновременно установлены признаки уретрита и цервицита (табл. 2).

Обсуждение результатов

В ходе молекулярного типирования *U. parvum* по гену *mba* в исследованной выборке было идентифицировано 3 серовара: серовар 3 (35 образцов), серовар 6 (32 образца) и серовар 1 (21 образец). В 2 образцах установлены мутации, не относящиеся к известным сероварам. Наиболее распространенными в исследованной выборке являлись серовары 3 и 6, что согласуется с результатами ранее проведенных исследований. Однако в связи с тем, что патогенность *U. parvum* в основном связывают с патологией беременности и новорожденных, большинство работ, посвященных поиску ассоциации сероваров *U. parvum* и клинического течения заболеваний, проводится на основании изучения клинического материала, полученного от новорожденных или беременных. Такие исследования свидетельствуют, что наиболее распространенными сероварами *U. parvum* у новорожденных с патологией респираторной системы являются серовары 3 и 6 [12]. Исследования, посвященные изучению у женщин клинических проявлений воспалительных заболеваний мочеполового тракта, связанных с *U. parvum*, немногочисленны и их данные противоречивы. Это объясняется тем, что исследователями формируются неравнозначные критерии при формировании групп, а также с трудностями диагностики сероваров *U. parvum* непосредственно в клиническом материале [13, 14].

Обращало на себя внимание, что в настоящем исследовании не было идентифицировано ни одного образца *U. parvum*, относящегося к серовару 14, в то время как по результатам большинства исследований этот серовар регистрировался в исследованных выборках [13—15].

Приведенные результаты позволяют предположить, что инфицирование сероваром 6 *U. parvum* чаще, чем инфицирование другими исследованными сероварами (1 и 3), приводит к развитию воспалительных заболеваний мочеполового тракта, сопровождающихся субъективными проявлениями воспалительных заболеваний урогенитального тракта ($p < 0,05$), а инфицирование сероваром 3 *U. parvum* сопровождается отсутствием клинико-лабораторных признаков инфекционного процесса ($p < 0,05$).

Заключение

Таким образом, в результате молекулярного типирования 90 образцов *U. parvum* по гену *mba* получено три генетических варианта, соответствующих сероварам 1 — у 21 (23,3%) пациентки, 3 — у 35 (38,9%) и 6 — у 32 (35,6%). При генетическом исследовании 2 (2,2%) образцов получены мутации, не относящиеся к распространенным сероварам. Инфицирование сероваром 6 *U. parvum* чаще других характеризовалось клинико-лабораторными признаками цервицита (65,6%), инфицирование сероваром 3 *U. parvum* — малосимптомным клиническим течением заболевания или отсутствием клинико-лабораторных признаков воспаления мочеполовой системы. ■

Литература

1. Yamazaki T., Matsumoto M., Matsuo J., Abe K., Minami K., Yamaguchi H. Frequency of Chlamydia trachomatis in Ureaplasma-positive healthy women attending their first prenatal visit in a community hospital in Sapporo, Japan. BMC Infect Dis 2012; 12: 82. doi: 10.1186/1471-2334-12-82.
2. De Francesco M.A., Negrini R., Pinsi G., Peroni L., Manca N.: Detection of Ureaplasma biovars and polymerase chain reaction-based subtyping of Ureaplasma parvum in women with or without symptoms of genital infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28: 641—646.
3. Zdrodowska-Stefanow B., Kłosowska W.M., Ostaszewska-Puchalska I., Bułhak-Koziol V., Kotowicz B. Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infection in women with urogenital diseases. Advances in Medical Sciences 2006; 51: 250—253.

4. Glass J.I., Lefkowitz E.J., Glass J.S., Heiner C.R., Chen E.Y., Cassell G.H. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* 2000; 407: 757—762.
5. Peterson S.N., Fraser C. M. The complexity of simplicity. *Genome Biology*. USA 2001; 2.
6. Woese C.R., Maniloff J., Zablent L.B.: Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 494—498.
7. Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. Микоплазмы. Молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика. СПб: Наука 2002; 319.
8. Teng, L.J., Zheng, X., Glass J.I., Watson H.L., Tsai T. & Cassell G.H. *Ureaplasma urealyticum* biovar specificity and diversity are encoded in multiple banded antigen gene. *J Clin Microbiol* 1994, 32: 1464—1469.
9. Dando S.J., Nitsos I., Kallapur S.G., Newnham J.P., Polglase G.R., Pillow J.J., Jobe A.H., Timms P., Knox C.L. The role of the multiple banded antigen of *Ureaplasma parvum* in intra-amniotic infection: major virulence factor or decoy? *PLoS One*. 2012; 7 (1): 29856.
10. Zheng X., Teng L.J., Watson H.L., Glass J.I., Blanchard A, et al. Small repeating units within the *Ureaplasma urealyticum* MB antigen gene encode serovar specificity and are associated with antigen size variation. *Infect Immun* 1995; 63: 891—898.
11. Kong F., Ma Z., James G., Gordon S., Gilbert G.L. Molecular genotyping of human *Ureaplasma* species based on multiple-banded antigen (MBA) gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; 50 Pt 5: 1921—1929.
12. Kasprzykowska U., Elias J., Elias M. Colonization of the lower urogenital tract with *Ureaplasma parvum* can cause asymptomatic infection of the upper reproductive system in women: a preliminary study. *Arch Gynecol Obstet* 2014 May; 289 (5): 1129—34.
13. Payne M.S., Tabone T., Kemp M.W., Keelan J.A., Spiller O.B., Newnham J.P. High-resolution melt PCR analysis for genotyping of *Ureaplasma parvum* isolates directly from clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2014 Feb; 52 (2): 599—606. doi: 10.1128/JCM.03036-13. Epub 2013 Dec 11.
14. De Francesco M.A., Negrimi R., Pinsi G., Peroni L., Manca M. *Ureaplasma* biovars and polymerase chain reaction-based subtyping of *Ureaplasma parvum* in women with or without symptoms of genital infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009; 28: 641—646.
15. Kong F., Ma I., James G., Gordon S., Gilbert G.L. Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. *J Clin Microbiol*. 2000; 38 (3): 1175—1179.

об авторах:

М.Р. Рахматулина — д.м.н., заместитель директора по лечебной работе ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва
 К.И. Плахова — к.м.н., старший научный сотрудник отдела ИППП ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва
 О.Н. Игонина — младший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и дерматозов ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье