

Генетические варианты генитальных микоплазм и их взаимосвязь с клиническим течением воспалительных заболеваний мочеполовой системы у женщин

М.Р. Рахматулина, К.И. Плахова, А.А. Кубанов

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

Цель исследования. Изучить генетическую вариабельность *M. hominis* (по гену *vaa*) и *M. genitalium* (по гену *mg192*), выделенных из образцов биологического материала, полученного от женщин с различными клиническими проявлениями воспалительных заболеваний мочеполовой системы и клинически здоровых женщин (для *M. hominis*).

Материал и методы. Методом секвенирования изучена генетическая вариабельность 20 образцов *M. hominis*, выделенных от пациенток с воспалительными заболеваниями мочеполовой системы, и 20 образцов *M. hominis*, выделенных от пациенток, не имевших клинических и лабораторных признаков воспалительного процесса мочеполовой системы. Также методом секвенирования изучена генетическая вариабельность 8 образцов *M. genitalium*, выделенных от пациенток с различными клиническими проявлениями воспалительных заболеваний мочеполовой системы.

Результаты. Определены три генетических варианта *M. hominis* по гену *vaa*. При этом установлено, что вариант I чаще выявлялся у пациенток с наличием клинических проявлений воспалительных заболеваний (65,0%), а вариант II — у клинически здоровых женщин (60,0%).

Выделены три филогенетические группы *M. genitalium* по гену *mg192*, при этом к группам I и II отнесено по 2 образца, к группе III — 4 образца. Образцы каждой из филогенетических групп получены от пациенток с клиническими и лабораторными признаками цервицита и уретрита.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о возможности влияния вариабельности поверхностного белка VAA на вирулентность условно-патогенного микроорганизма *M. hominis*.

Ключевые слова: *M. hominis*, *M. genitalium*, ген *vaa*, ген *mg192*.

Genetic variants of genital mycoplasmas and their relation to the clinical course of inflammatory diseases of the urogenital system in women

M.R. Rakhmatulina, K.I. Plakhova, A.A. Kubanov

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

Goal of the study. To study genetic variability of *M. hominis* (based on the *vaa* gene) and *M. genitalium* (based on the *mg192* gene) derived from biological material samples taken from women with different clinical manifestations of inflammatory diseases of the urogenital system and clinically healthy women (for *M. hominis*).

Materials and methods. Genetic variability of twenty *M. hominis* samples taken from patients with inflammatory diseases of the urogenital system and twenty *M. hominis* samples taken from patients without clinical and laboratory signs of inflammatory processes of the urogenital system was studied by the sequence analysis method. Genetic variability of eight *M. genitalium* samples taken from patients with different clinical signs of inflammatory diseases of the urogenital system was also examined by the sequence analysis method.

Results. Three genetic variants of *M. hominis* based on the *vaa* gene were found; variant I was revealed more often in patients with clinical manifestations of inflammatory diseases (65.0%), and variant II — in clinically healthy women (60.0%).

Three phylogenetic *M. genitalium* groups based on the *mg192* gene were revealed; two samples were referred to Groups I and II, and four samples were referred to Group III. Samples from each phylogenetic groups were taken from patients with clinical and laboratory manifestations of cervicitis and urethritis.

Conclusion. The study data demonstrate a potential effect of the VAA surface protein on the virulence of opportunistic *M. hominis* pathogens.

Key words: *M. hominis*, *M. genitalium*, *vaa* gene, *mg192* gene.

Corresponding author: rahmatulina@cniivi.ru. Vestnik Dermatologii i Venerologii 2014; 6: 107—113.

■ *Mycoplasma hominis* и *Mycoplasma genitalium*, относящиеся к классу *Mollicutes*, являются близкими по таксономии микроорганизмами, характеризующимися отсутствием клеточной мембраны, малым размером генома и тропностью к слизистым оболочкам мочеполовых органов человека. Результаты эпидемиологических и экспериментальных исследований последних лет убедительно доказали, что *M. genitalium* является патогенным инфекционным агентом, вызывающим уретрит, цервицит, а также воспалительные заболевания органов малого таза. *M. hominis* в настоящее время рассматривается экспертами как условно-патогенный микроорганизм, способный при воздействии определенных факторов проявлять свою патогенность и потенцировать развитие уретрита, цервицита и/или вагинита [1—5].

Несмотря на общепризнанную этиологическую роль микоплазм в развитии патологических процессов мочеполовой системы, вопросы патогенеза воспалительных заболеваний, ассоциированных с *M. hominis* и *M. genitalium*, остаются недостаточно изученными.

Одним из современных направлений исследования факторов вирулентности бактерий является поиск переменных генов, кодирующих белки с различными свойствами. Наибольший интерес представляют научные работы, посвященные изучению вариантов поверхностных белков, обладающих антигенными свойствами и определяющих адгезивные свойства бактерий, которые могут в различной степени влиять на вирулентность микроорганизма.

Одним из основных белков *M. hominis*, обладающим антигенными и адгезивными свойствами, является белок VAA (variable adherence-associated antigen). В научных исследованиях, посвященных изучению его вариативности, описано пять типов (категорий, вариантов) гена *vaa*. Классификация гена *vaa*, предложенная Т. Voesen и соавт., основана на результатах собственных исследований, продемонстрировавших, что каждый вариант гена *vaa* обладает специфическим набором генных кассет (или модулей), определяющим уникальную первичную структуру [6, 7]. Всего выделено 8 вариантов модулей, два из которых являются постоянными, а остальные в различной последовательности составляют структуру гена, при этом не все модули входят в состав структуры каждого варианта гена. Исследователи считают, что, возможно, вариативность данного гена и, как следствие, белка VAA определяет наличие или отсутствие вирулентных свойств *M. hominis*. В то же время большинство работ, посвященных генетическому полиморфизму *M. hominis*, сфокусированы на изучении молекулярной структуры гена *vaa*, а не на поиске взаимосвязи генетических вариантов микроорганизма с клиническими проявлениями воспалительных заболеваний мочеполового тракта [6—8]. Это прежде всего связано с техническими трудностями включения в одно исследова-

ние рутинных клинических и лабораторных методов обследования и сложных трудоемких молекулярно-генетических методик изучения генетических свойств микроорганизмов.

Изучение генетической вариативности *M. genitalium* позволило исследователям выделить в качестве объекта для поиска факторов вирулентности ген *mg192*. Кодируемый геном *mg192* белок P110 входит в состав поверхностного белкового комплекса *M. genitalium* и принимает участие в процессах адгезии микроорганизма. При этом известно, что ген *mg192* обладает изменчивостью, за счет которой определяется фенотипическое многообразие поверхностных белков микроорганизма [9].

Современными исследователями проводилось изучение генетической вариативности *M. genitalium* по гену *mg192*, однако ее взаимосвязь с клиническими проявлениями воспалительных заболеваний мочеполовой системы до настоящего времени достоверно не определена.

Цель исследования: изучить генетическую вариативность *M. hominis* (по гену *vaa*) и *M. genitalium* (по гену *mg192*), выделенных из образцов биологического материала, полученного от женщин с различными клиническими проявлениями воспалительных заболеваний мочеполовой системы и клинически здоровых женщин (для *M. hominis*).

Материал и методы

На основании данных клинического обследования и результатов лабораторных тестов в исследование было включено 48 пациенток: у 40 женщин по результатам лабораторных исследований была идентифицирована *M. hominis*, у 8 женщин — *M. genitalium*.

С целью изучения ассоциации генетических вариантов *M. hominis* с развитием воспалительных заболеваний мочеполовой системы пациентки, инфицированные *M. hominis* ($n = 40$), были разделены на две группы:

1-я группа — пациентки с воспалительными заболеваниями мочеполовой системы ($n = 20$);

2-я группа — пациентки, не имеющие клинических и лабораторных признаков воспалительного процесса мочеполовой системы и обратившиеся для проведения профилактического обследования ($n = 20$).

Для изучения ассоциации генетических вариантов *M. genitalium* с клиническим течением воспалительных заболеваний мочеполовой системы в исследование были включены больные уретритом и цервицитом, инфицированные *M. genitalium*, — 3-я группа ($n = 8$).

Критериями включения в исследование являлись:

■ возраст от 20 до 40 лет;

■ идентификация *M. hominis* в биологическом материале (соскоб уретры, цервикального канала и материал заднего свода влагалища) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или культу-

ральным методом (DUO, Biorad) и наличие клинических и лабораторных признаков воспалительных заболеваний мочеполовой системы — для пациенток 1-й группы;

- идентификация *M. hominis* в биологическом материале (соскоб уретры, цервикального канала и материал заднего свода влагалища) методом ПЦР и/или культуральным методом (DUO, Biorad) и отсутствие клинических и лабораторных признаков воспалительных заболеваний мочеполовой системы — для пациенток 2-й группы;
- идентификация *M. genitalium* в биологическом материале (соскоб уретры, цервикального канала и материал заднего свода влагалища) методом ПЦР — для пациенток 3-й группы.

Из исследования исключались пациентки, у которых методом ПЦР и/или культуральным методом были выявлены *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis*, вирус простого герпеса, *Ureaplasma spp.*

Диагностическим критерием, подтверждающим наличие уретрита, являлось обнаружение 10 и более полиморфно-ядерных лейкоцитов в поле зрения в отделяемом уретры. Диагностическим критерием, подтверждающим наличие вагинита, являлось обнаружение 20 и более полиморфно-ядерных лейкоцитов в поле зрения в вагинальном отделяемом при соотношении лейкоцитов и клеток плоского эпителия более 1:1. Диагностическим критерием, подтверждающим наличие цервицита, являлось обнаружение 10 и более полиморфно-ядерных лейкоцитов в поле зрения в отделяемом цервикального канала и наличие слизисто-гнойных выделений из цервикального канала.

Для исследования генетической вариабельности *M. hominis* и *M. genitalium* были выбраны гены, кодирующие поверхностные белки, которые отвечают за антигенные адгезивные свойства микроорганизмов: ген *vaa Mycoplasma hominis* и ген *mg192 Mycoplasma genitalium*. Для изучения вариабельных участков генов были разработаны праймеры, позволяющие амплифицировать всю кодирующую область генов *vaa Mycoplasma hominis* и *mg192 Mycoplasma genitalium* (табл. 1).

Выделение бактериальной ДНК проводилось с помощью Epcuslo полимеразы (Евроген, Россия), разработанной с целью амплификации сложных смесей ДНК с низким содержанием матрицы. Дальнейшие

этапы изучения вариабельности генов осуществлялись с использованием метода секвенирования на генетическом анализаторе 3130 Genetic Analyzer с последующим анализом нуклеотидных последовательностей с помощью компьютерной программы MEGA5.

Результаты исследования

Результаты изучения генетической вариабельности *M. hominis* по гену *vaa*

Средний возраст пациенток, инфицированных *M. hominis*, составил 24,6 года. Отсутствие субъективных симптомов урогенитальных заболеваний было зарегистрировано у 21 (52,5%) обследованной женщины, 20 из которых были включены во 2-ю группу в связи с отсутствием клинических и лабораторных признаков воспалительного процесса. У одной из пациенток, несмотря на отсутствие жалоб со стороны мочеполовой системы, были выявлены объективные симптомы вульвовагинита, в связи с чем она была включена в 1-ю группу исследования.

Жалобы со стороны мочеполовой системы при обращении предъявляли 19 (95%) обследованных пациенток: 14 (70%) — на наличие патологических выделений из половых путей, 5 (25%) — на учащенное и/или болезненное мочеиспускание, 4 (20%) — зуд и/или жжение в области наружных половых органов, 3 (15%) — на боль внизу живота тянущего характера, 2 (10%) — на болезненность при половых контактах.

При гинекологическом обследовании отклонения от нормы были выявлены только у пациенток 1-й группы: гиперемия слизистой оболочки вульвы — у 2 (10%) женщин, гиперемия слизистой оболочки наружного отверстия уретры — у 1 (5%), гиперемия слизистой оболочки влагалища — у 17 (85%) женщин. Патологические выделения в заднем своде влагалища были выявлены у 2 (10%) пациенток 1-й группы, в том числе у 1 (5%) — сливкообразные гомогенные, у 1 (5%) — слизисто-гнойные. Патологические изменения слизистой оболочки шейки матки (гиперемия и/или отечность) регистрировались у 19 (95%) пациенток 1-й группы, патологические выделения из цервикального канала слизисто-гнойного характера — у 20 (100%) пациенток 1-й группы.

Отклонения от нормы по результатам микроскопического исследования также были установлены толь-

Таблица 1

Последовательности праймеров, использованные для амплификации генов *vaa Mycoplasma hominis* и *mg192 Mycoplasma genitalium*

<i>vaa_full_for</i>	CCG CTA TTT TGC CAG TTG CTA CTA
<i>vaa_full_rev</i>	GTG CCC ATT AGT AGC ACT ATT TTT TG
<i>mg192_for</i>	CAC TAG CCA ATA CCT TCC TTG TCA AA
<i>mg192_rev</i>	AAC ACA ACC GCT CCA TAG TTA GCT T

ко у пациенток 1-й группы: повышенное содержание лейкоцитов в цервикальном канале — у 20 (100%), в уретре — у 5 (25%), во влагалище — у 5 (25%). У всех пациенток 2-й группы, инфицированных *M. hominis*, результаты микроскопического исследования биологического материала, полученного из уретры, заднего свода влагалища и цервикального канала, соответствовали нормальным показателям.

При сопоставлении данных клинического осмотра и лабораторных исследований у пациенток 1-й группы были верифицированы следующие урогенитальные заболевания: уретрит — у 5 (25%), цервицит — у 20 (100%), вагинит — у 5 (25%) обследованных; у 10 (50%) пациенток клинические и лабораторные признаки цервицита выявлены в сочетании с признаками уретрита и/или вагинита.

В результате амплификации гена *vaa M. hominis* было идентифицировано три генетических варианта: вариант гена *vaa I* — в 18 (45,0%) образцах; вариант гена *vaa II* — в 20 (50,0%) образцах; вариант гена *vaa III* — в 2 (5,0%) образцах (рис. 1).

При этом распределение различных генетических вариантов *M. hominis* в 1-й и 2-й группах обследованных пациенток являлось неоднородным. Так, вариант I чаще выявлялся у клинически здоровых пациенток 2-й группы — у 12 (60,0%), чем у пациенток 1-й группы, имевших признаки воспалительных заболеваний мочеполового тракта, — у 6 (30,0%). Генетический вариант II, напротив, чаще регистрировался у пациенток 1-й группы — у 13 (65,0%), а во 2-й груп-

пе выявлялся лишь у 7 (35,5%) обследованных. Вариант III гена *vaa* был выявлен лишь у 2 (5,0%) пациенток 1-й и 2-й групп.

Результаты изучения генетической variability M. genitalium по гену mg192

Средний возраст пациенток, инфицированных *M. genitalium*, составил 25,4 года.

Субъективные симптомы заболеваний урогенитального тракта отсутствовали только у 1 (12,5%) женщины, остальные пациентки — 7 (87,5%) предъявляли различные жалобы со стороны мочеполовой системы: на патологические выделения из половых путей — 5 (62,5%), нарушение мочеиспускания — 5 (62,5%); зуд, жжение в области наружных половых органов — 1 (12,5%); болезненность при половом акте — 2 (25,0%) и боль внизу живота — 2 (25,0%).

При физикальном осмотре у 3 (37,5%) женщин была выявлена гиперемия слизистой оболочки наружного отверстия уретры, у 2 (25,0%) — патологические выделения в заднем своде влагалища (слизисто-гнойного и сливкообразного характера). Изменения слизистой оболочки шейки матки в виде гиперемии и/или отека наблюдались у 7 (87,5%) обследованных пациенток; патологические выделения из цервикального канала слизисто-гнойного характера — у 6 (75,0%) пациенток.

Отклонения от нормы по результатам микроскопического исследования были установлены у всех пациенток 3-й группы: повышенное содержание лейкоцитов в цервикальном канале — у 6 (75,0%) па-

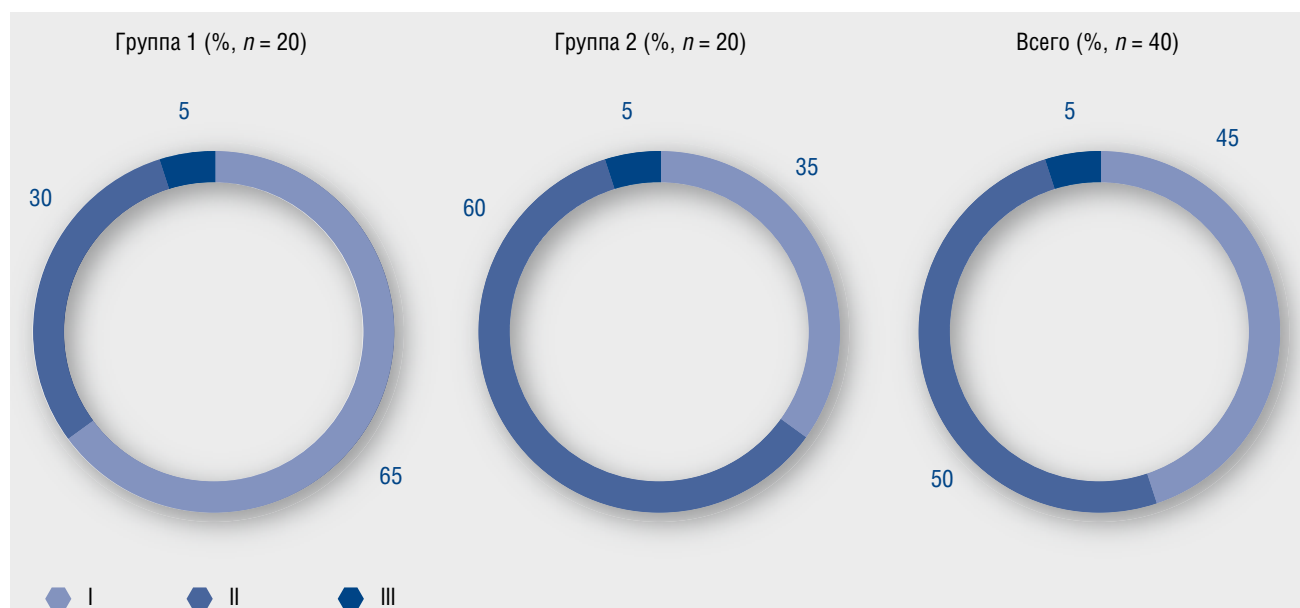


Рис. 1. Распределение генетических вариантов гена *vaa M. hominis* в группах обследованных пациенток

циенток, в уретре — у 4 (50,0%), во влагалище — у 2 (25,0%) пациенток.

При сопоставлении данных клинического осмотра и лабораторных исследований у пациенток, инфицированных *M. genitalium*, были верифицированы уретрит — у 4 (50,0%) и цервицит — у 6 (75,0%).

Результаты молекулярного типирования *M. genitalium* по гену *mg192* позволили разделить образцы *M. genitalium* на три условные филогенетические группы по гену *mg192* (рис. 2), при этом каждому исследованному образцу был присвоен порядковый номер от 1 до 8:

I филогенетическая группа по гену *mg192* — образцы 1 и 3;

II филогенетическая группа по гену *mg192* — образцы 2 и 4;

III филогенетическая группа по гену *mg192* — образцы 5—8.

Образцы, отнесенные к I филогенетической группе, были получены от пациенток, имевших клиниче-

ские и лабораторные признаки цервицита и уретрита (1 образец) и только цервицита (1 образец). Образцы, отнесенные ко II филогенетической группе, также были получены от пациенток с клиническими и лабораторными признаками уретрита и цервицита (1 образец) и только цервицита (1 образец). Образцы, отнесенные к III филогенетической группе, были получены от пациенток с клиническими и лабораторными признаками цервицита (2 образца) и уретрита (2 образца) (табл. 2). Таким образом, пациентки с различными клиническими вариантами воспалительных заболеваний мочеполовой системы были инфицированы *M. genitalium*, относящимися к различным филогенетическим группам.

Обсуждение результатов

В ходе молекулярного типирования были определены генетические варианты *M. hominis* по гену *vaa* — I, II, III. Описанные ранее Т. Voesen и соавт. генетические варианты IV и V в обследованной выборке образ-

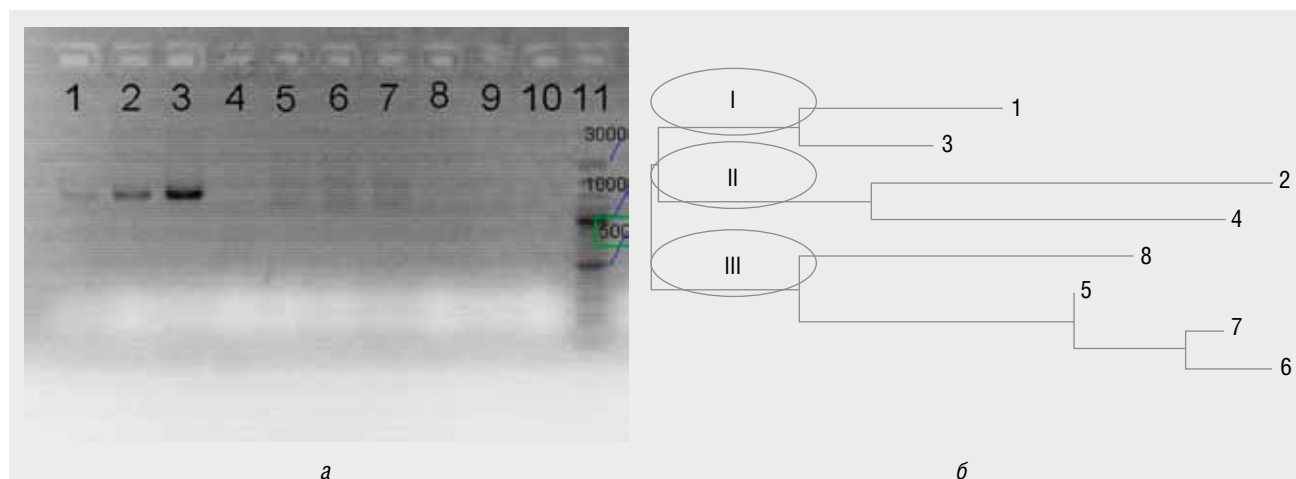


Рис. 2. Электрофоретическое разделение в агарозном геле — а (дорожка 11 — маркер молекулярных масс; 1, 2, 3, 5, 6, 7 — ПЦР-продукты). Филогенетический анализ последовательностей гена *mg192 Mycoplasma genitalium* — б (1—8 — штаммы, полученные от разных пациенток)

Таблица 2

Распределение генетических вариантов *M. genitalium* по гену *mg192* в зависимости от филогенетической группы и клинических проявлений воспалительных заболеваний мочеполовой системы обследованных пациенток (*n* = 8)

Группа	Уретрит	Цервицит
I группа	1	1, 3
II группа	2	2, 4
III группа	5, 6	7, 8

Примечание. Цифры 1—8 — порядковый номер исследованных образцов.

цов *M. hominis* не определялись [6, 7]. Вариант III, который наиболее близок по структуре к варианту II, был идентифицирован только в двух образцах. Большая часть исследованных образцов *M. hominis* ($n = 38$) относилась к генетическим вариантам I и II.

При сравнении частоты идентификации генетических вариантов гена *vaa M. hominis*, участвующего в адгезии микроорганизма к эпителиальной клетке и обладающего выраженными вариabельными антигенными свойствами, у пациенток 1-й и 2-й групп (с наличием клинических проявлений урогенитальных заболеваний и клинически здоровых) были получены значимые различия. Вариант I выявлялся чаще у пациенток с наличием клинических проявлений воспалительных заболеваний, а вариант II — у клинически здоровых лиц. Различия распределения генетических вариантов *M. hominis* в образцах, полученных от пациенток с наличием и отсутствием клинических и лабораторных признаков воспалительных заболеваний мочеполовой системы, подтверждают предположение о влиянии вариabельности гена *vaa* на вирулентность *M. hominis*.

Вариabельность гена *mg192 M. genitalium*, как предполагают ученые, также может влиять на вирулентность *M. genitalium*. В настоящем исследовании были выделены образцы *M. genitalium*, относящиеся

к трем различным филогенетическим группам по гену *mg192*, но малочисленность выборки не позволила сделать выводы о наличии или отсутствии взаимосвязи генетических вариантов *M. genitalium* с особенностями клинического течения воспалительных заболеваний мочеполовой системы.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о возможности влияния вариabельности поверхностного белка VAA на вирулентность условно-патогенного микроорганизма *M. hominis*, тем самым определяя наличие или отсутствие клинических проявлений воспалительных заболеваний мочеполового тракта. В то же время вариabельность гена *mg192 M. genitalium*, возможно, не изменяет или незначительно изменяет свойства поверхностного белка, не снижая или не повышая вирулентность патогенного микроорганизма *M. genitalium*. Факторы, определяющие вирулентность условно-патогенных генитальных микоплазм, могут обладать более выраженной вариabельностью, чем патогенного *M. genitalium*, а условия, при которых условно-патогенный микроорганизм проявляет свои патогенные свойства, могут определяться не только окружающей средой, но и заложенными в самом микроорганизме генетическими особенностями. ■

Литература

- Shipitsyna E., Savicheva A., Solokovskiy E. et al. Guidelines for the laboratory diagnosis of Mycoplasma genitalium infections in East European countries. Acta dermato-venereologica 2010 Sep; 90 (5): 461—7.
- Manhart L.E., Kay N. Mycoplasma genitalium: is it a sexually transmitted pathogen? Current infectious disease reports 2010 Jul; 12 (4): 306—13.
- Workowski K.A., Berman S., Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. MMWR Recomm Rep 2010 Dec 17; 59 (RR-12): 1—110.
- Yasuda M., Maeda S., Deguchi T. In vitro activity of fluoroquinolones against Mycoplasma genitalium and their bacteriological efficacy for treatment of M. genitalium-positive nongonococcal urethritis in men. Clin Infect Dis 2005 Nov 1; 41 (9): 1357—9.
- Yokoi S., Maeda S., Kubota Y. et al. The role of Mycoplasma genitalium and Ureaplasma urealyticum biovar 2 in postgonococcal urethritis. Clin Infect Dis 2007 Oct 1; 45 (7): 866—71.
- Boesen T., Emmersen J. et al. The Mycoplasma hominis vaa gene displays a mosaic gene structure. Molecular Microbiology 1998; 29: 97—110.
- Boesen T., Fedosova N., Kjeldgaard M. et al. Molecular design of Mycoplasma hominis Vaa adhesin. Protein Science/2001, 10: 2577—2586.
- Gorshkov O.V., Chernov V.V. et al. Genetic polymorphism of Mycoplasma variability of cytoadhesin genes in clinical isolates of Mycoplasma hominis. Biochemistry and biophysics 2005; 404: 328—331.
- Ma L., Jensen J., Mancuso M., et al. Genetic variation in the Complete MgPa Operon and Its Repetitive Chromosomal Elements in Clinical Strains of Mycoplasma genitalium. PLoS One 2010; 5 (12).

об авторах: ▶

М.Р. Рахматулина — д.м.н., зам. директора по научно-клинической работе ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва
К.И. Плахова — д.м.н., старший научный сотрудник отдела инфекций, передаваемых половым путем, ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

А.А. Кубанов — д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

Конфликт интересов

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