

doi: 10.17116/klinderma201514274-81

Алгоритм лабораторного обследования пациентов на наличие инфекций, вызванных *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, методами полимеразно-цепной реакции и реакции транскрипционной амплификации

А.Е. ГУШИН¹, П.Г. РЫЖИХ¹, Г.А. ХАЙРУЛЛИНА¹, В.И. КИСИНА²¹ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, 111123; ²Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии Департамента здравоохранения Москвы, Москва, Россия, 119071

An Algorithm of a Laboratory Examination of Patients for *Neisseria Gonorrhoeae*, *Chlamydia Trachomatis*, *Mycoplasma Genitalium* and *Trichomonas Vaginalis* Infections Using the Polymerase Chain Reaction and the Transcriptional Amplification Reaction

A.E. GUSHCHIN, P.G. RYZHIKH, G.A. KHAYRULLINA, V.I. KISINA

¹Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russian, 111123; ²Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Moscow, Russia, 119071

В настоящее время отсутствует унифицированный алгоритм лабораторного обследования пациентов с инфекциями, передаваемыми половым путем (ИППП). Место новых высокоэффективных методов (молекулярно-биологические) в лабораторной диагностике, таких как реакция транскрипционной амплификации НАСБА и полимеразно-цепная реакция (ПЦР), требует детального уточнения. **Цель исследования** — разработка алгоритма лабораторного исследования для выявления *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *M. genitalium* с использованием методов ПЦР и НАСБА. **Материал и методы.** Для проведения ПЦР были использованы наборы АмплиСенс *N. gonorrhoeae*/*C. trachomatis*/*M. genitalium*/*T. vaginalis* — МУЛЬТИПРАЙМ-FL. Для определения РНК использованы наборы реагентов на основе метода НАСБА АмплиСенс *Neisseria gonorrhoeae* — РИБОТЕСТ, АмплиСенс *Chlamydia trachomatis* — РИБОТЕСТ, АмплиСенс *Trichomonas vaginalis* — РИБОТЕСТ и АмплиСенс *Mycoplasma genitalium* — РИБОТЕСТ. Для разработки алгоритма лабораторного исследования проведена оценка диагностических характеристик используемых наборов на основе методов ПЦР и НАСБА в сравнении с другими методами диагностики: бактериоскопическим, серологическим, бактериологическим. **Основные результаты.** Был предложен алгоритм лабораторного обследования на основе методов ПЦР и НАСБА при диагностике гонококковой инфекции, хламидийной, трихомонадной и вызванной *Mycoplasma genitalium*. Использование данного алгоритма позволило подтвердить наличие трихомонадной инфекции у 32 пациентов с отрицательными результатами бактериоскопии и ГИ — у 26. Кроме того, у 3 пациентов с положительными результатами бактериоскопии диагноз ТИ был исключен. **Заключение.** Внедрение в практику алгоритма для диагностики инфекций, вызванных *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis* на основе методов ПЦР и НАСБА, позволит повысить качество оказания медицинской помощи больным ИППП и унифицировать использование различных методов диагностики в клинической практике.

Ключевые слова: инфекции, передаваемые половым путем, лабораторные методы, бактериоскопия, полимеразная цепная реакция, НАСБА.

Currently, there is no unified algorithm of a laboratory examination of patients with sexually transmitted infections (STIs). The applicability of new high-performance (biomolecular) methods, such as the NASBA transcriptional amplification reaction and the polymerase chain reaction (PCR), in laboratory diagnosis requires a detailed clarification. **The aim** of the study was to develop an algorithm of a laboratory examination for detection of *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, and *M. genitalium* using PCR and NASBA. **Material and Methods.** The *AmpliSens N.gonorrhoeae/C.trachomatis/M.genitalium/T.vaginalis* — MULTIPRAYM-FL kits were used for PCR. The *AmpliSens Neisseria gonorrhoeae* — RIBOTEST, *AmpliSens Chlamydia trachomatis* — RIBOTEST, *AmpliSens Trichomonas vaginalis* — RIBOTEST and *AmpliSens Mycoplasma genitalium* — RIBOTEST NASBA-based kits were used to determine RNA. For developing a laboratory examination algorithm, evaluation of diagnostic characteristics of the used PCR and NASBA-based kits in comparison with other diagnostic (bacterioscopic, serological, bacteriological) methods was performed. **Results.** A PCR and NASBA-based algorithm of a laboratory examination was proposed for diagnosing gonococcal, chlamydial, trichomonal and *Mycoplasma genitalium* infections. Based on this algorithm, the trichomonal infection in 32 patients with negative bacterioscopy and the gonococcal infection in 26 patients were confirmed. In addition, the trichomonal infection diagnosis was excluded in three patients with positive bacterioscopy. **Conclusion.** Practical application of the PCR and NASBA-based algorithm for diagnosis of *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* and *T. vaginalis* infections will improve the quality of care for STI patients and standardize the use of various diagnostic methods in clinical practice.

Keywords: sexually transmitted infections, laboratory methods, bacterioscopy, polymerase chain reaction, NASBA.

Инфекции, передаваемые половым путем (ИППП), относятся к социально-значимым. Наиболее важная роль в развитии репродуктивной патологии отводится облигатно-патогенным микроорганизмам — *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*. В последние годы получены доказательства роли инфекции, вызванной *Mycoplasma genitalium* (МГИ), в развитии уретрита у мужчин, цервицита и воспалительных заболеваний малого таза (ВЗОМТ) у женщин [1].

Как в отечественных, так и в зарубежных руководствах для диагностики ИППП — хламидийной (ХИ), гонококковой (ГИ), трихомонадной (ТИ) инфекций, — а также МГИ, рекомендован набор лабораторных тестов, включая молекулярно-биологические методы (МБМ) [2–6]. Различные методы диагностики имеют разные показатели чувствительности/специфичности, наиболее высокие из которых у МБМ. В ряде зарубежных рекомендаций указывается, что при использовании для диагностики ХИ и ГИ метода амплификации нуклеиновых кислот для подтверждения его результатов некорректно использовать метод, обладающий более низкой чувствительностью, например методы прямой иммунофлюоресценции (ПИФ), бактериоскопии, микроскопии (МС) и даже КП (культуральный посев). В этих случаях рекомендовано использование другого МБМ, направленного на выявление иной генетической мишени или типа нуклеиновой кислоты [7, 8]. За рубежом разработано и коммерчески доступно несколько технологий, таких как:

- ПЦР (выявление ДНК возбудителей ИППП)
- Roche Amplicor (manufactured by Roche Diagnostics Corporation, Basel, Switzerland), Abbott RealTime CT/NG («Abbott Laboratories», Abbott Park, Illinois);
- SDA (выявление ДНК) — Becton Dickinson BDProbeTec ET (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey);
- ТМА (выявление РНК) — Gen-Probe АРТМА (Gen-Probe, Incorporated, San Diego, California).

Однако их использование в алгоритме обследования ограничивается высокой стоимостью каждой из технологий, разными платформами амплификации и протоколами. К тому же они недоступны для российского рынка. В нашей стране разработаны и промышленно выпускаются наборы реагентов на основе ПЦР, а также наборы реагентов для выявления РНК возбудителей ИППП (*N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. vaginalis*) и *M. genitalium* — НАСБА (NASBA, Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) в реальном времени.

Особенностью технологии НАСБА является то, что мишенью служат многокопийные молекулы рибосомальной РНК. Количество копий рибосомальной РНК в живых клетках бактерий или простейших может достигать от нескольких тысяч до нескольких десятков тысяч, что обеспечивает возможность об-

наружения возбудителя даже при его минимальной концентрации в образце биоматериала [9, 10]. Использование в качестве мишени для НАСБА видоспецифических участков рибосомальной РНК обеспечивает методу высокую специфичность. Другой особенностью методики является то, что РНК — менее стабильный по сравнению с ДНК тип генетического материала, который быстрее деградирует при разрушении клеток, поэтому на основании результатов выявления РНК можно судить о наличии в образце жизнеспособных микроорганизмов, например, после проведенного лечения [11, 12]. С практической точки зрения важно, что для проведения НАСБА в лабораторных условиях используется то же оборудование, что и для проведения ПЦР в реальном времени. Кроме того, исходный биоматериал после ПЦР может исследоваться методом НАСБА. В результате этого существует возможность интегрирования указанного метода в протокол лабораторного обследования, что позволит верифицировать возбудителя.

Цель настоящего исследования — разработка алгоритма лабораторного обследования пациентов для выявления *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *M. genitalium* с использованием методов ПЦР и НАСБА.

Материал и методы

В исследовании были использованы наборы реагентов марки *Амплиценс* производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Для выявления ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *M. genitalium* был использован тест на основе мультиплексной ПЦР в реальном времени *Амплиценс N. gonorrhoeae/C. trachomatis/M. genitalium/T. vaginalis* — МУЛЬТИПРАЙМ-FL, позволяющий в процессе реакции амплификации выявлять ДНК указанных микроорганизмов одновременно. Для определения РНК данных возбудителей были использованы наборы реагентов на основе метода НАСБА *Амплиценс Neisseria gonorrhoeae* — РИБОТЕСТ, *Амплиценс Chlamydia trachomatis* — РИБОТЕСТ, *Амплиценс Trichomonas vaginalis* — РИБОТЕСТ и *Амплиценс Mycoplasma genitalium* — РИБОТЕСТ. Все наборы прошли клинические испытания, имеют регистрационные удостоверения и разрешены для применения в лабораторной практике в России.

Для разработки алгоритма лабораторного исследования была проведена оценка диагностических характеристик используемых наборов реагентов на основе методов ПЦР и НАСБА в сравнении с другими методами диагностики — МС, ПИФ, КП.

Разработанный алгоритм был апробирован при ретроспективном тестировании образцов биологического материала, полученных от пациентов, обратившихся в разные филиалы Московского научно-

практического центра дерматовенерологии и косметологии в 2012 г., где были выявлены *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *M. genitalium* методами ПЦР, БС и КП в зависимости от назначенного врачом метода лабораторной диагностики. Более детально характеристика групп пациентов и результаты планового и ретроспективного лабораторного обследований описаны в работе В.И. Кисиной и соавт. [13]. Образцы, в которых одним из методов были обнаружены *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *M. genitalium*, хранились при температуре -20°C до проведения текущего исследования методом НАСБА с использованием соответствующих наборов *РИБОТЕСТ* с целью выявления РНК указанных микроорганизмов.

В общей сложности, в рамках разработанного алгоритма методом НАСБА было протестировано 259 образцов, из которых в 41 образце было показано наличие *N. gonorrhoeae* методами ПЦР и выявление диплококков при использовании БС; в 55 образцах была обнаружена *T. vaginalis* методами ПЦР и МС; в 103 образцах и в 60 образцах были обнаружены соответственно *C. trachomatis* и *M. genitalium* методом ПЦР.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ возможностей ПЦР, НАСБА и других методов диагностики ГИ, ХИ, МГИ и ТИ.

По результатам предыдущих исследований, в том числе международных, нами был проведен сравнительный анализ чувствительности и специфичности используемых в данном исследовании МБМ (ПЦР и НАСБА) и традиционных (КП, МС, ПИФ) методов диагностики ИППП, применяемых в кожно-венерологической службе [14–22]. Результаты представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, при выявлении инфекций, вызванных *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *M. genitalium*, МБМ ПЦР и НАСБА обладают самой высокой чувствительностью и специфичностью,

приближающимися к 100%. Чувствительность традиционных методов диагностики варьирует в широком диапазоне, но значительно ниже, чем у ПЦР и НАСБА.

При манифестной гонококковой инфекции у мужчин чувствительность МС и КП достаточно высокие и достигают 91,7 и 98,9% соответственно. Однако у женщин даже при наличии выраженных клинических симптомов чувствительность МС находится в пределах 36,2%, а КП — до 89,7% [14]. При этом на качество культивирования серьезное влияние оказывают как тип и техника получения биоматериала, так и качество сред, в результате чего чувствительность культурального посева может снижаться до 50% [15, 16]. Чувствительность методов ПЦР и НАСБА, по результатам независимых исследований, в меньшей степени зависит от типа биоматериала и пола пациентов. Для ПЦР она определена в пределах 98,9–100%, для НАСБА — 90–100% [16, 22].

Для диагностики ХИ наиболее доступным и распространенным в учреждениях дерматовенерологического профиля методом до 2008 г. оставался ПИФ. Так, его использовали 94% лабораторий [23]. Однако основной проблемой метода является субъективность при интерпретации результатов [24]. В исследовании Е.В. Ширшовой [21] было показано, что одни и те же результаты ПИФ в интерпретации двух независимых специалистов в большинстве случаев выглядели по-разному и имели высокий процент несовпадений как по положительным результатам, так и по отрицательным. Итоговое значение чувствительности метода ПИФ составило 33%, а специфичности — 77,1%. При этом совпадение результатов, выполненных методами ПЦР и НАСБА, составило 100% случаев [21]. В исследовании, проведенном Е.В. Шипицыной и соавт. [19], метод культивирования хламидий в культуре эукариотических клеток при специфичности 100% имел чувствительность 78,4%. Это согласуется с результатами исследования С. Black и соавт. [25], в котором чувствительность метода культивирования хламидий соста-

Таблица 1. Сравнительный анализ чувствительности разных методов диагностики гонококковой, хламидийной, трихомонадной и микоплазменной инфекций

Возбудитель	Чувствительность методов диагностики (%)				
	ПЦР	НАСБА	МС	ПИФ	КП
<i>N. gonorrhoeae</i> (у мужчин)	98,9–100	100	75–91,7	—	50–98,9
<i>N. gonorrhoeae</i> (у женщин)	98,3–100	90,9–100	31,8–36,2	—	31,8–89,7
<i>C. trachomatis</i>	89,7–100	89,7–100	—	33,3%	78,4
<i>M. genitalium</i>	80–95,1	95,1	—	—	—
<i>T. vaginalis</i>	100	100	86,7	—	54,5

вила 74,7%. В настоящее время клинические рекомендации (как российские от Российского общества дерматовенерологов и косметологов РОДВиК 2012 г., так и зарубежные) по диагностике и лечению пациентов с ХИ не рекомендуют метод ПИФ к практическому применению для диагностики этой инфекции. Показатели чувствительности МБМ (ПЦР и НАСБА) для диагностики ХИ с использованием наборов разных российских производителей по результатам международной валидации составили от 89,7 до 100% [18, 19, 26].

Для диагностики инфекции, вызванной *M. genitalium*, в настоящее время МБМ являются альтернативными из-за крайне малых размеров микроорганизма и трудностей культивирования. Культивирование *M. genitalium* в специальных условиях занимает до 50 сут [27]. Определенная в результате сравнительных с другими вариантами МБМ чувствительность ПЦР и НАСБА находилась в пределах от 80 до 95,1%.

Для диагностики ТИ (так же, как и ГИ) наиболее широко в нашей стране используется микроскопический метод диагностики. Трихомонады довольно крупные микроорганизмы и хорошо видны при бактериоскопии. Их бактериоскопическая идентификация проводится на основании формы и размеров клеток, часто эксцентрично расположенного ядра, вакуолизированной цитоплазмы и наличия жгутиков. Однако в биологическом материале присутствует много клеточных элементов (клетки эпителия влагалища и их предшественников — парабазальных клеток, макрофагов, лейкоцитов, клеток-предшественников сперматогенеза — сперматоцитов), сопоставимых по размеру и клеточной морфологии с клетками трихомонад, которые можно принять за простейшие [28]. Это приводит к ложноположительным результатам МС. В работе Е.В. Шипициной и соавт. [18] при изучении 16% образцов методом бактериоскопии был получен «сомнительный» результат. В зарубежных работах чувствительность МС определена в пределах 30—70% [29—33]. КП при диагностике ТИ требует длительного культивирования (до 7—9 сут), особенно для исключения трихомонадной инфекции. К тому же трихомонады весьма требовательны к питательным средам и температурному режиму. В среднем чувствительность КП, по результатам зарубежных исследований, составляет 60—95% [29—33]. При несоблюдении этих условий чувствительность КП может быть невысокой — 54,5% [18].

В зарубежных исследованиях показано, что МБМ на сегодня обладают самой высокой чувствительностью и специфичностью при диагностике ТИ — от 85 до 100% [29—33]. Достигается это благодаря тому, что генетические мишени, которые выявляются МБМ, присутствуют в геноме во множестве копий, поэтому возможно выявление даже единич-

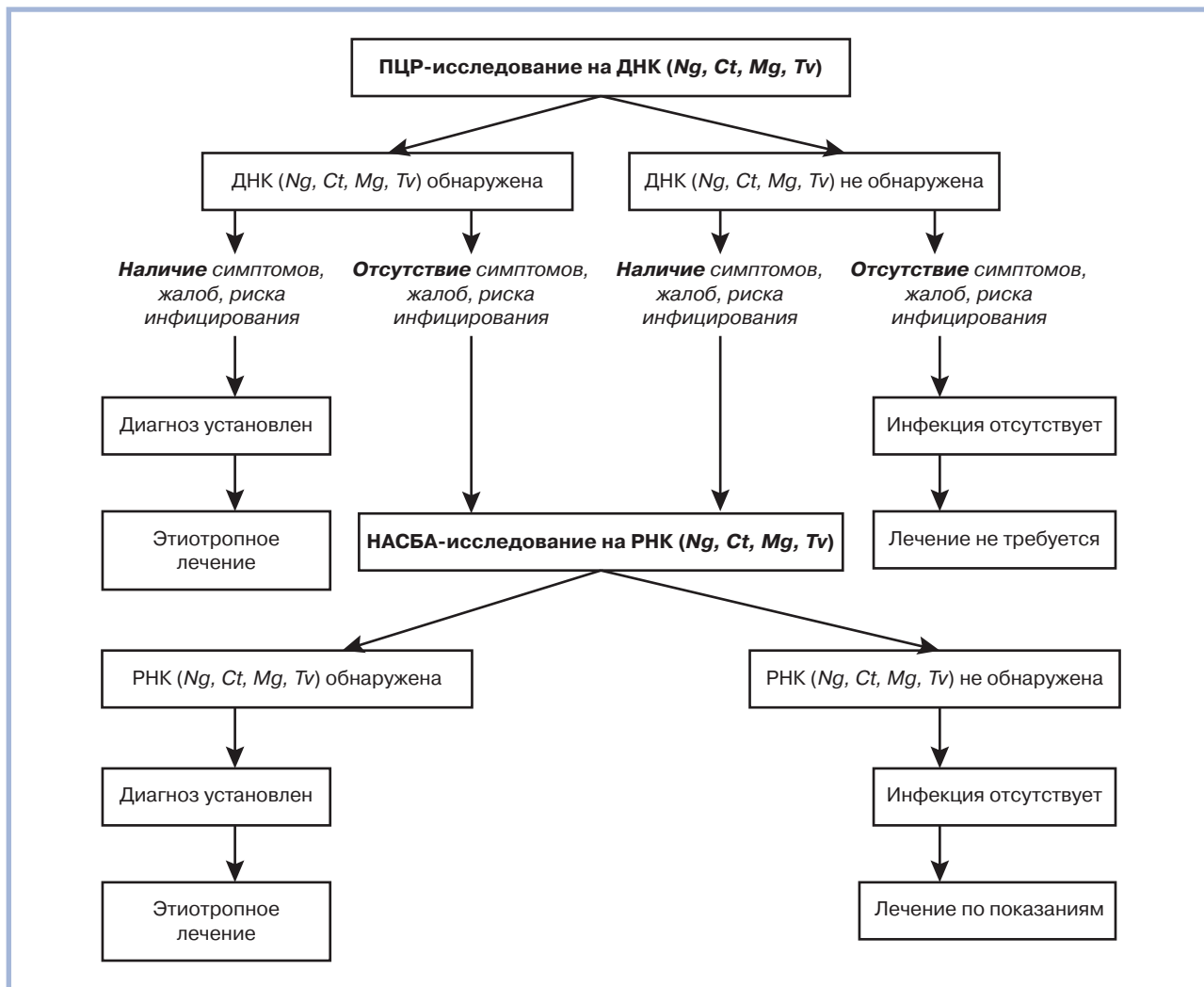
ных клеток. При прямом сравнении МС, КП и МБМ было показано, что ПЦР и НАСБА позволяют определять трихомонады в значительно более низких концентрациях, чем с помощью МС и КП [18, 20].

Таким образом, у значительного числа пациентов, инфицированных какими-либо из указанных возбудителей, традиционные методы (МС, ПИФ, КП) не позволяют выявить инфекцию, а использование в комбинации с ними МБМ приводит к появлению у определенного числа несоответствующих результатов, что создает проблему окончательного установления диагноза. Возникает проблема подтверждения наличия или отсутствия инфекции с учетом перечисленных особенностей всех методов диагностики. Согласно зарубежным рекомендациям, при использовании какого-либо из МБМ, основным из которых в нашей стране является метод ПЦР, некорректно в качестве второго метода диагностики использовать методы с меньшей чувствительностью (ПИФ, МС, КП). Правильным является использование альтернативного МБМ, направленного на выявление другой генетической мишени или типа нуклеиновой кислоты [7, 8]. В этом отношении в роли подтверждающего теста мог бы выступать метод НАСБА, чувствительность которого, как показано выше, совпадает с ПЦР и выше, чем у традиционных тестов.

На рисунке представлен алгоритм лабораторного обследования пациентов для диагностики инфекций, вызванных *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis* на основе методов ПЦР и НАСБА. Предложенный алгоритм предполагает использование метода ПЦР в качестве основного скринингового метода диагностики ИППП, обладающего высокой чувствительностью и специфичностью. Анализ результатов ПЦР проводится с учетом анамнеза заболевания, анамнеза жизни, эпидемиологического и сексуального анамнезов и результатов оценки объективных симптомов заболевания.

При обнаружении ДНК указанных возбудителей на фоне клинической картины урогенитальной инфекции (уретрит у мужчин, цервицит, вагинит, наличие патологических влагалищных выделений у женщин), смены полового партнера без использования барьерной контрацепции, наличии многочисленных половых партнеров, диагноз инфекции можно считать установленным, и подтверждение наличия возбудителя методом НАСБА не требуется.

У пациентов без жалоб, симптомов и риска инфицирования ИППП при наличии ДНК возбудителей целесообразно исходный биоматериал исследовать методом НАСБА на наличие РНК выявленных микроорганизмов. В этом случае обнаружение и ДНК, и РНК микроорганизмов является основанием для установления диагноза соответствующей инфекции даже при отсутствии субъективных клини-



Алгоритм лабораторного обследования пациентов для диагностики инфекций, вызванных *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, на основе методов ПЦР и НАСБА.

Ng — *N. gonorrhoeae*, Ct — *C. trachomatis*, Mg — *M. genitalium*, Tv — *T. vaginalis*.

ческих проявлений инфекции. Если же РНК возбудителя не обнаружена (при отсутствии симптомов и повышенного содержания лейкоцитов), это свидетельствует об отсутствии жизнеспособных микроорганизмов и может трактоваться как отсутствие инфекции.

Если при первичном обследовании методом ПЦР ДНК возбудителей не обнаружена, но при этом имеются клинические признаки инфекции или положительные результаты других лабораторных тестов, то для уточнения диагноза целесообразно применение метода НАСБА. Наличие РНК возбудителя при отсутствии детектируемой ДНК может быть свидетельством низкой концентрации возбудителя в образце, не детектируемой методом ПЦР. Положительные результаты традиционных лабораторных тестов (МС, ПИФ и КП) в отсутствие РНК

и ДНК возбудителей следует рассматривать как ложноположительные.

Применение метода НАСБА при получении отрицательного результата ПЦР у пациентов без симптомов и клинических проявлений инфекции нецелесообразно по экономическим соображениям.

Практическое применение алгоритма лабораторного исследования с использованием методов ПЦР и НАСБА для уточнения диагноза ИППП

Предлагаемый алгоритм был апробирован при ретроспективном исследовании образцов биоматериала, полученного от пациентов и исследованного разными методами. Первичное обследование пациентов при диагностике ГИ и ТИ проводилось с использованием методов ПЦР и МС [13]. Результаты

Таблица 2. Сравнение результатов выявления *N. gonorrhoeae* и *T. vaginalis* методами МС, ПЦР и НАСБА

Возбудитель	Результат исследований	Пол	n	Положительный результат НАСБА
<i>N. gonorrhoeae</i>	ПЦР+	м	14	14
	МС+	ж	0	т/н
	ПЦР+	м	17	16
	МС–	ж	10	10
	ПЦР–	м	0	т/н
	МС+	ж	0	т/н
<i>T. vaginalis</i>	ПЦР+	м	0	т/н
	МС+	ж	12	12
	ПЦР+	м	16	16
	МС–	ж	17	16
	ПЦР–	м	3	0
	МС+	ж	0	т/н

Примечание. т/н — тестирование не проводилось.

исследования с использованием метода НАСБА представлены в табл. 2.

Результаты исследования на наличие *N. gonorrhoeae*

У мужчин методом ПЦР ДНК *N. gonorrhoeae* была выявлена у 31 пациента. Только у 14 из них при МС мазка из уретры были обнаружены внутриклеточно расположенные грамотрицательные диплококки и высокое содержание лейкоцитов (5 и более в поле зрения), что позволило этим пациентам поставить диагноз гонореи. У остальных 14 пациентов ДНК *N. gonorrhoeae* обнаруживали на фоне лабораторных признаков уретрита, т.е. повышенного содержания лейкоцитов (5 и более в поле зрения), а у 3 больных — при нормальном уровне лейкоцитов в мазке из уретры (менее 5 в поле зрения). Среди обследованных женщин ДНК *N. gonorrhoeae* методом ПЦР была выявлена у 10 пациенток, и у всех из них МС не выявила наличие внутриклеточно расположенных грамотрицательных диплококков. Ретроспективное исследование образцов методом НАСБА позволило установить наличие РНК во всех образцах, полученных от женщин, и в 30 (из 31) — от мужчин, в которых присутствовала ДНК *N. gonorrhoeae*. Один из мужчин с отрицательными результатами НАСБА не имел клинических проявлений инфекции и лабораторных признаков уретрита. Случаев, когда обнаруживались грамотрицательные диплококки на фоне отрицательных результатов ПЦР, зафиксированы не были ни среди мужчин, ни среди женщин.

Результаты исследования на наличие *T. vaginalis*

У мужчин ДНК *T. vaginalis* была выявлена у 16 пациентов, при этом результаты МС были отрицательными. Еще у троих пациентов, наоборот, сообщалось о выявлении *T. vaginalis* в МС, при этом ДНК *T. vaginalis* не обнаруживалась.

Среди обследованных женщин ДНК *T. vaginalis* обнаружена у 39 пациенток. Из них при МС исследовании *T. vaginalis* была обнаружена у 12 женщин, у 17 — при наличии ДНК *T. vaginalis* результаты МС были отрицательными. У 10 больных результаты МС отсутствовали.

Тестирование образцов с помощью реакции НАСБА подтвердило наличие РНК у всех мужчин с положительными результатами МС, у которых обнаруживалась ДНК *T. vaginalis*. У 3 мужчин с положительными результатами МС и отрицательными результатами ПЦР НАСБА не выявила РНК простейших, что в итоге позволило считать результаты МС ложноотрицательными. У женщин с отрицательными результатами МС только в одном из 17 образцов при наличии ДНК не было обнаружено РНК *T. vaginalis*. Еще один образец, в котором не содержалась РНК *T. vaginalis*, был получен от женщины, для которой данных по МС предоставлено не было.

Результаты исследования на наличие *C. trachomatis*

Исследование ПЦР на *C. trachomatis* назначали большинству пациентов, обратившихся к врачу-дерматовенерологу. С помощью разработанного алгоритма верификацию диагноза ХИ проводили

47 женщинам и 56 мужчинам с обнаруженной методом ПЦР ДНК *C. trachomatis*. Только у двоих пациентов — одного мужчины и одной женщины — не была обнаружена РНК *C. trachomatis*. Больные не предъявляли жалоб и не имели симптомов инфекции, а обратились к врачу с целью профилактического обследования. При этом один из пациентов отметил, что принимал доксициклин до момента обследования с профилактической целью. У остальных пациентов методом НАСБА была выявлена РНК *C. trachomatis*.

Результаты исследования на наличие *M. genitalium*

ДНК *M. genitalium* методом ПЦР была обнаружена у 46 мужчин и 14 женщин. При ретроспективном исследовании образцов методом НАСБА РНК *M. genitalium* не была обнаружена лишь у одного мужчины. Клинические данные по этому пациенту отсутствовали.

Применение предложенного алгоритма позволило установить наличие инфекции на основании обнаружения методами ПЦР и НАСБА двух типов нуклеиновых кислот — ДНК и РНК, присутствующих в жизнеспособных клетках возбудителей. Это обеспечило правомочность установления диагноза, даже если другие методы, в частности МС, дали отрицательные результаты.

Были получены несколько результатов, когда при наличии ДНК возбудителя его РНК, тем не менее, не была обнаружена. Возможны следующие причины. Большинство пациентов, при исследовании материалов которых результаты НАСБА были отрицательными, не имели симптомов инфекции. Тестирование образцов методом НАСБА проводилось ретроспективно, после длительного хранения и, несмотря на то что хранение проводилось в замороженном состоянии, в процессе исследования образцы подвергались неоднократному замораживанию и размораживанию, в результате чего могло произойти разрушение клеток микроорганизмов и деградация РНК. Нельзя исключить, что некоторые пациенты принимали антибактериальные препараты на этапе, предшествующем обращению к врачу, что также могло привести к потере жизнеспособно-

сти возбудителей и деградации РНК. Наконец, нельзя исключить ложноположительные результаты ПЦР в результате контаминации инфицированным биоматериалом образцов с неинфицированным, ошибок лабораторного и медицинского персонала.

Заключение

До настоящего времени в нашей стране обследование на ИППП осуществляется в разных профильных учреждениях в соответствии с уровнем знаний, квалификации и собственного опыта отдельных специалистов. Не разработаны единые для всех специалистов (дерматовенерологи, акушеры-гинекологи, урологи и др.) алгоритмы ведения больных с ИППП, а значительное число рутинных лабораторных исследований, обладающих низкой чувствительностью и специфичностью, все еще используются в клинической практике. Вместе с тем в последние годы в нашем распоряжении появились новые высокоэффективные методы лабораторной диагностики, которые, хотя и с некоторым опозданием, появляются в документах, регламентирующих оказание медицинской помощи больным ИППП. К этим методам, в частности, относятся ПЦР и НАСБА. Данные методы были использованы в настоящем исследовании для сравнения результатов, полученных традиционными методами. В результате анализа данных, полученных на основе традиционных методов и МБМ, а также наличие или отсутствие жалоб со стороны пациентов, был разработан алгоритм лабораторного обследования пациентов для диагностики инфекций, вызванных *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, на основе методов ПЦР и НАСБА. Использование данного алгоритма позволило подтвердить наличие ТИ у 32 пациентов с отрицательными результатами МС, а ГИ — у 26. Кроме того, у 3 пациентов с положительными результатами МС диагноз ТИ был исключен. Внедрение разработанного алгоритма позволит повысить качество оказания медицинской помощи больным ИППП и унифицировать использование различных методов диагностики ИППП в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Taylor-Robinson D, Jensen JS. Mycoplasma genitalium: from Chrysalis to multicolored butterfly. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(3):498-514.
2. Клинические рекомендации. Ведение больных инфекциями, передаваемыми половым путем, и урогенитальными инфекциями. Под общ. ред. А.А. Кубановой. М 2012.
3. Lanjouw E, Ossewaarde JM, Sary A, Boag F, van der Meijden WI. European guideline for the management of Chlamydia trachomatis infections. *Int J STD AIDS.* 2010;21(11):729-737.
4. Bignell C, Unemo M. European STI Guidelines Editorial Board. European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS.* 2013;24(2):85-92.
5. Shahmanesh M, Moi H, Lassau F, Janier M. IUSTI/WHO. European guideline on the management of male non-gonococcal urethritis. *Int J STD AIDS.* 2009;20(7):458-464.
6. Sherrard J, Donders G, White D, Jensen JS. European IUSTI. European (IUSTI/WHO) guideline on the management of vaginal discharge, 2011. *Int J STD AIDS.* 2011;22(8):421-429.
7. Johnson RE, Newhall WJ, Papp JR, Knapp JS, Black CM, Gift TL, Steece R, Markowitz LE, Devine OJ, Walsh CM, Wang S, Gunter DC, Irwin KL, DeLisle S, Berman SM. Screening tests to detect Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infections — 2002. *MMWR Recomm Rep.* 2002;51(RR-15):1-38.

8. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th edition. Ram S., Rice P.A. Chapter 144. *Gonococcal Infections*. 2012.
9. Morré SA, Sillekens P, Jacobs MV, van Aarle P, de Blok S, van Gemen B, Walboomers JM, Meijer CJ, van den Brule AJ. RNA amplification by nucleic acid sequence-based amplification with an internal standard enables reliable detection of Chlamydia trachomatis in cervical scrapings and urine samples. *J Clin Microbiol*. 1996;34(12):3108-3114.
10. Mahony JB, Song X, Chong S, Faught M, Salonga T, Kapala J. Evaluation of the NucliSens Basic Kit for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in genital tract specimens using nucleic acid sequence-based amplification of 16S rRNA. *J Clin Microbiol*. 2001;39(4):1429-1435.
11. Birch L, Dawson CE, Cornett JH, Keer JT. A comparison of nucleic acid amplification techniques for the assessment of bacterial viability. *Lett Appl Microbiol*. 2001;33(4):296-301.
12. Keer JT, Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J Microbiol Methods*. 2003;53(2):175-183.
13. Кисина В.И., Гушин А.Е., Колиева Г.Л., Потекаев Н.Н. Урогенитальные инфекции, передаваемые половым путем: проблемы сложившейся практики ведения больных в дерматовенерологических учреждениях Москвы. *Клиническая дерматология и венерология*. 2013;6:67-71.
14. Цеслюк М.В., Гушин А.Е., Савочкина Ю.А., Быков А.С., Шипулин Г.А. Сравнение методов лабораторной диагностики Neisseria gonorrhoeae с применением расширенного «золотого стандарта». *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008;7:48-52.
15. Шипицына Е.В., Максимова А.А., Гушин А.Е., Мартикайнен З.М., Рыжих П.Г., Савичева А.М., Соколовский Е.В., Шипулин Г.А., Домейка М., Унемо М. Качество лабораторной диагностики гонококковой инфекции. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2008;3:60-66.
16. Shipitsyna E, Guschin A, Maximova A, Tseslyuk M, Savicheva A, Sokolovsky E, Shipulin G, Domeika M, Unemo M. Comparison of microscopy, culture and in-house PCR and NASBA assays for diagnosis of Neisseria gonorrhoeae in Russia. *APMIS*. 2008;116(2):133-138.
17. Shipitsyna E, Zolotoverkhaya E, Dohn B, Benkovich A, Savicheva A, Sokolovsky E, Jensen JS, Domeika M, Unemo M. First evaluation of polymerase chain reaction assays used for diagnosis of Mycoplasma genitalium in Russia. *JEADV*. 2009;23:1164-1172.
18. Шипицына Е.В., Золотоверхая Е.А., Григорьев А.Н., Рыжкова О.С., Шалепо К.В., Ломакина О.А., Протасова Е.П., Романцева С.Ю., Тангатарова Е.М., Литвиненко И.В., Смирнова Т.С., Савичева А.М. Оценка методов амплификации нуклеиновых кислот для диагностики трихомониаза. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2011;2:73-79.
19. Шипицына Е.В., Воробьева Н.Е., Савичева А.М., Соколовский Е.В., Гушин А.Е., Рыжих П.Г., Шипулин Г.А., Кротин П.Н., Меркулова Л.В., Ландина О.Ю. Применение метода Nucleic Acid Sequence-Based Amplification в реальном времени (NASBA-Ral-Time) для диагностики урогенитальной хламидийной инфекции. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2005;4:17-21.
20. Гушин А.Е., Рыжих П.Г., Махлай Н.С. Сравнение пределов обнаружения микроскопии, культурального посева и методов амплификации нуклеиновых кислот, используемых в лабораторной практике для выявления Trichomonas vaginalis. *Клиническая дерматология и венерология*. 2012;3:16-21.
21. Ширишова Е.В. *Дифференциальная диагностика уретрита, обусловленного инфекциями, передаваемыми половым путем, с помощью современных методов амплификации нуклеиновых кислот*. М. 2007.
22. Shipitsyna E, Zolotoverkhaya E, Hjelmvoll SO, Maximova A, Savicheva A, Sokolovsky E, Skogen V, Domeika M, Unemo M. Evaluation of six nucleic acid amplification tests used for diagnosis of Neisseria gonorrhoeae in Russia compared with an international strictly validated real-time porA pseudogene polymerase chain reaction. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009;23(11):1246-1253.
23. Фриго Н.В., Ротанов С.В., Лесная И.Н., Полетаева О.А., Полевщикова С.А. Лабораторная диагностика ИППП в Российской Федерации. Результаты национального исследования. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2008;5:33-41.
24. Black C.M. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10(1):160-184.
25. Black CM, Marrazzo J, Johnson RE, Hook EW.3rd, Jones RB, Green TA, Schachter J, Stamm WE, Bolan G, St Louis ME, Martin DH. Head-to-head multicenter comparison of DNA probe and nucleic acid amplification tests for Chlamydia trachomatis infection in women performed with an improved reference standard. *J Clin Microbiol*. 2002;40(10):3757-3763.
26. Shipitsyna E, Zolotoverkhaya E, Agné-Stadling I, Krysanova A, Savicheva A, Sokolovsky E, Domeika M, Unemo M. First evaluation of six nucleic acid amplification tests widely used in the diagnosis of Chlamydia trachomatis in Russia. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009;23(3):268-276.
27. Tully JG, Taylor-Robinson D, Cole RM, Rose DL. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. *Lancet*. 1981;1(8233):1288-1291.
28. Долгов В.В., Луганская С.А., Фанченко Н.Д., Миронова И.И., Назарова Е.К., Ракова Н.Г., Раков С.С., Селиванов Т.О., Щелочков А.М. *Лабораторная диагностика мужского бесплодия*. М. 2005.
29. Madico G, Quinn TC, Rompalo A, McKee KT.Jr, Gaydos CA. Diagnosis of Trichomonas vaginalis infection by PCR using vaginal swab samples. *J Clin Microbiol*. 1998;36(11):3205-3210.
30. van Der Schee C, van Belkum A, Zwiijgers L, van Der Brugge E, O'Neill EL, Luijckendijk A, van Rijsoort-Vos T, van Der Meijden W, Verbrugh H, Sluiter HJ. Improved diagnosis of Trichomonas vaginalis infection by PCR using vaginal swabs and urine specimens compared to diagnosis by wet mount microscopy, culture, and fluorescent staining. *J Clin Microbiol*. 1999;37(12):4127-4130.
31. Patel SR, Wiese W, Patel SC, Ohl C, Byrd JC, Estrada CA. Systematic review of diagnostic tests for vaginal trichomoniasis. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2000;8(5-6):248-257.
32. Jordan JA, Lowery D, Trucco M. TaqMan-based detection of Trichomonas vaginalis DNA from female genital specimens. *J Clin Microbiol*. 2001;39(11):3819-3822.
33. Caliendo AM, Jordan JA, Green AM, Ingersoll J, Diclemte RJ, Wingood GM. Real-time PCR improves detection of Trichomonas vaginalis infection compared with culture using self-collected vaginal swabs. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2005;13(3):145-150.