

Мониторинг лечения пациентов с инфекцией, вызванной *Mycoplasma genitalium* с помощью методов ПЦР и НАСБА в реальном времени

К.б.н. А.Е. ГУШИН¹, врач О.А. БУРЦЕВ², н.с. П.Г. РЫЖИХ¹, д.м.н., проф. М.А. ГОМБЕРГ³,
к.м.н. Г.А. ШИПУЛИН¹

¹ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; ²Государственный научный центр дерматовенерологии; ³Московский государственный медико-стоматологический университет, Медсанчасть №7 ФМБА, Москва

Monitoring treatment of patients with *Mycoplasma genitalium* infection using PCR and NASBA in real time

A.E. GUSHCHIN¹, O.A. BURTSEV², P.G. TYZHNIK¹, M.A. GOMBERG³, G.A. SHIPULIN¹

¹Central Research Institute of Epidemiology, Rospotrebnadzor; ²State Research Dermatovenerological Centre, Rosmedtekhologii; ³State Medico-Stomatological University, Medical Station No 7, FMBA, Moscow

Ключевые слова: негонококковые уретриты (НГУ), мониторинг, *Mycoplasma genitalium*, джозамицин, отделяемое из уретры, первая порция мочи (ППМ), ПЦР, НАСБА в реальном времени.

Key words: non-gonococcal urethritis (NGU), monitoring, *Mycoplasma genitalium*, josamycin, urethral secretion, first portion of the urine sample, PCR, NASBA in real time.

В настоящее время накоплено достаточное количество клинико-эпидемиологических наблюдений и экспериментальных данных, свидетельствующих о самостоятельной этиопатогенетической роли *Mycoplasma genitalium* в развитии воспалительных заболеваний урогенитального тракта мужчин и женщин. В предыдущей работе мы показали, что инфекция, вызванная *M. genitalium*, протекает у мужчин в большинстве случаев в манифестной форме, сопровождаясь выраженными клиническими проявлениями и жалобами пациентов, обуславливая необходимость проведения лечебных мероприятий; при этом доля уретритов, вызванных *M. Genitalium*, составляет по разным данным от 15 до 30% среди НГУ [1]. Однако, как показали несколько исследований, существующие в настоящий момент схемы лечения негонококковых уретритов (НГУ), эффективные в отношении основного возбудителя НГУ — *Chlamydia trachomatis*, оказались менее эффективны в отношении *M. genitalium*. Лечение тетрациклиновыми препаратами пациентов с уретритом, вызванным *M. genitalium*, приводило к рецидиву инфекции в 63% случаев [2], а лечение азитромицином в дозировке и по протоколу лечения хламидийного

уретрита не давало эффекта в 18—28% случаев [3, 4]. В связи с этим поиск альтернативных схем лечения является важнейшей практической задачей. Результаты исследований *in vitro* показывают, что наиболее эффективными препаратами в отношении *M. genitalium* являются макролиды и некоторые фторхинолоны, однако, как уже отмечалось выше на примере лечения азитромицином, полученные данные *in vitro* не могут автоматически переноситься на клиническую ситуацию. Объективная оценка эффективности препарата в отношении возбудителя основывается не только на данных по чувствительности клеточной культуры клинического изолята, получаемых *in vitro*, но и на основании клинического и микробиологического эффекта, получаемого при лечении пациентов. Широко используемый в клинической практике для лечения различных инфекций препарат *джозамицин* (*вильпрафен*, *Астеллас Фарма*) по результатам *in vitro* имеет высокую активность и в отношении *M. genitalium*, и в предыдущей работе мы продемонстрировали первые результаты, отражающие его высокую эффективность при лечении пациентов с НГУ, вызванным *M. genitalium* [5]. В настоящем исследовании мы предложили оценивать эф-

фektivность протокола лечения *джозамицином* на основании результатов динамического наблюдения, клинических и лабораторных признаков уретрита, а также скорости элиминации возбудителя при выявлении генетического материала *M. genitalium* — ДНК и рибосомальных РНК (рРНК) непосредственно в процессе лечения.

Целью настоящего исследования явилось изучение динамики элиминации *M. genitalium* у мужчин с уретритом в процессе терапии *джозамицином* с использованием методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и НАСБА (Nucleic Acids Sequence-Based Amplification).

Материал и методы

Пациенты. В Научно-консультативном диагностическом отделении ГНЦД Росмедтехнологий за период с декабря 2006 г. по декабрь 2008 г. были обследованы 344 пациента мужского пола в возрасте от 18 до 66 лет, обратившихся с жалобами по поводу выделений из мочеиспускательного канала и дерматических явлений или для обследования в связи с имевшимся незадолго до визита в клинику половым контактом с непостоянным партнером. При обследовании пациентов проводили сбор и анализ урологического анамнеза и анамнеза половой жизни, визуальную оценку состояния кожных покровов и слизистых оболочек органов мочеполовой системы, наличие и характер выделений из уретры.

В соответствии с установленными в Центре процедурами и нормативными документами всем пациентам назначали обычные лабораторные исследования, направленные на установление лабораторных признаков уретрита (наличие более 4 лейкоцитов в поле зрения при микроскопическом исследовании с 1000-кратным увеличением не менее чем 5 полей зрения препарата, окрашенного по Граму) и выявления возбудителей инфекций, передаваемых половым путем (ИППП) — *Neisseria gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, а также *M. genitalium*. В случае обнаружения возбудителей ИППП лечение назначали в зависимости от этиологии инфекции.

Лечение пациентов с инфекцией, вызванной *M. genitalium*. Пациентам с инфекцией, вызванной *M. genitalium*, назначали *джозамицин* (*вильпрафен*, *Астеллас Фарма*) в дозе 500 мг 3 раза в день в течение 10 дней. После окончания лечения пациентам предлагалось пройти клинический и лабораторный контроль на 28–30-й день после окончания терапии.

Мониторинг лечения пациентов с инфекцией, вызванной *M. genitalium*. Пациентам, у которых при скрининге была обнаружена *M. genitalium* и которые удовлетворяли другим критериям включения (см. ниже), было предложено принять участие в наблюдательном исследовании, направленном на изучение динамики клинических и лабораторных показате-

лей инфекции в процессе терапии *джозамицином*, а также сразу после окончания терапии. Мониторинг эффективности лечения проводили согласно схеме, отраженной на рисунке. Всех пациентов, включенных в протокол мониторинга, приглашали к врачу непосредственно перед началом лечения, в процессе терапии — на 3-й и 8-й дни лечения (3 д/л и 8 д/л), а также на 2-й и 28-й дни после лечения (2 д/пл и 28 д/пл). Во время визитов у пациентов оценивали наличие жалоб и клинических проявлений инфекции, а также проводили лабораторные исследования. В день визита пациентам было предложено собрать первую порцию утренней мочи в объеме 10–20 мл. На приеме у пациента получали отделяемое из уретры для микроскопического исследования и исследования молекулярно-биологическими методами.

Критерии включения. Критериями включения в протокол исследования являлись:

- установленная инфекция, вызванная *M. genitalium*;
- отсутствие гонококковой, трихомонадной и герпетической инфекций;
- отсутствие клинических признаков осложненной урогенитальной инфекции: уретропростатита, везикулита, орхоэпидидимита.

Оценка эффективности лечения и элиминации *M. genitalium*. Критерием эффективного лечения уретрита, вызванного *M. genitalium*, явилось:

- отсутствие субъективных и объективных признаков уретрита;
- количественное содержание лейкоцитов при микроскопическом исследовании менее 4 в поле зрения при исследовании не менее 5 полей зрения;
- отсутствие ДНК и рРНК *M. genitalium* при исследовании с помощью методов ПЦР и НАСБА в реальном времени двух типов клинического материала — первой порции утренней мочи (ППМ) и отделяемого из уретры.

Методы ПЦР и НАСБА, используемые в мониторинге терапии. Мониторинг терапии проводился в ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора с использованием наборов реагентов для ПЦР с детекцией в реальном времени «Амплисенс *Mycoplasma genitalium*-FRT» и наборов реагентов для реакции транскрипционной амплификации НАСБА в реальном времени «Амплисенс *Mycoplasma genitalium*-РИБОТЕСТ» согласно инструкциям к указанным тест-системам.

Результаты

В процессе клинико-лабораторного обследования диагноз НГУ был установлен у 242 пациентов. Среди них инфекция, вызванная *M. genitalium*, была выявлена у 51 (21%) пациента. Подробная характеристика клинических проявлений большей части

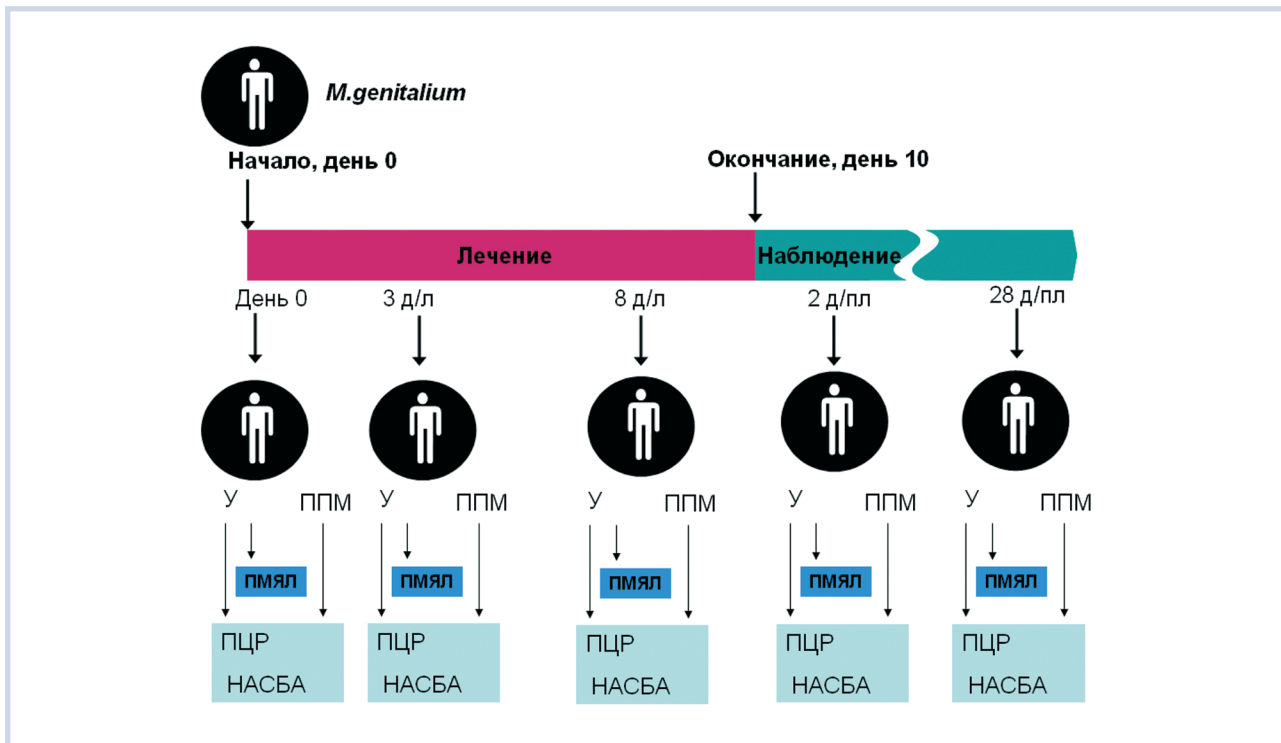


Рисунок. Мониторинг результатов лечения джозамицином (вильпрафеном).

3 д/л, 8 д/л — 3-й и 8-й дни лечения; 2 д/пл, 28 д/пл — 2-й и 28-й дни после лечения; У — соскобное отделяемое из уретры; ППМ — первая порция мочи; ПМЯЛ — полиморфно-ядерные лейкоциты; ПЦР — полимеразная цепная реакция; НАСБА — Nucleic Acids Sequence-Based Amplification.

Таблица 1. Динамика выявления клинических и лабораторных маркеров уретрита и генетических маркеров *M. genitalium* у 46 пациентов в процессе терапии джозамицином

Период исследования	Наличие ДНК и/или рРНК <i>M. genitalium</i>	Наличие клинических признаков уретрита	Наличие лабораторных признаков уретрита
До лечения	46 (100%)	40 (100%)	43 (100%)
3 д/л	33 (71,7%)	26 (65%)	32 (74,4%)
8 д/л	14 (30,4%)	10 (25%)	28 (65%)
2 д/пл	6 (13%)	4 (10%)	17 (39,5%)
28 д/пл	3 (6,5%)	2 (5%)	2 (4,6%)

обследованных пациентов представлена в нашей предыдущей работе [5].

Всем пациентам, инфицированным *M. genitalium*, была назначена соответствующая терапия джозамицином. Данные по контролю результатов терапии были получены у 49 пациентов, которые и составили группу оценки клинической и микробиологической эффективности; 2 пациента из 51 не явились на контрольное обследование.

В протоколе мониторинга эффективности лечения, график и процедуры которого представлены на рисунке, согласились принять участие 46 пациентов с подтвержденным инфицированием *M. genitalium*. В указанной группе пациентов до начала терапии у 6 человек отсутствовали жалобы и клинические проявления инфекции, из них у 2 отсутствовали и лабораторные признаки уретрита. Еще у одного пациен-

та в отсутствие лейкоцитов в отделяемом из уретры имелись жалобы на боль при мочеиспускании.

В общем виде результаты мониторинга представлены в табл. 1.

Следует отметить достаточно быструю нормализацию клинического статуса пациентов на фоне лечения джозамицином. К 3-му дню лечения у более 1/3 пациентов исчезли субъективные признаки инфекции, остальные пациенты (за исключением 2) отметили положительную динамику лечения и уменьшение выраженности симптомов инфекции по сравнению периодом до начала терапии. К 8-му дню лечения те или иные субъективные ощущения и слабые клинические признаки уретрита остались только у 10 (25%) пациентов. На 2-й день после окончания терапии отмечались жалобы незначительный зуд и дискомфорт в уретре у оставшихся 4 пациентов.

Таблица 2. Результаты сравнения частоты выявления ДНК и рРНК *M. genitalium* в разных типах клинического материала — соскобе из уретры и ППМ — на разных сроках лечения джозамицином

Период исследования и число пациентов	<i>M. genitalium</i> , результаты ПЦР			рРНК <i>M. genitalium</i> (НАСБА)		
	У: «ДНК+» ППМ: «ДНК+»	У: «ДНК+» ППМ: «ДНК-»	У: «ДНК-» ППМ: «ДНК+»	У: «ДНК+» ППМ: «ДНК+»	У: «ДНК+» ППМ: «ДНК-»	У: «ДНК-» ППМ: «ДНК+»
До лечения 46 (100%)	46 (100%)	0	0	46 (100%)	0	0
3 д/л 33 (100%)	18 (54,5%)	4 (12%)	8 (24,2%)	25 (75%)	2 (6%)	6 (18%)
8 д/л 14 (100%)	2 (14%)	2 (14%)	8 (57%)	6 (43%)	3 (21%)	3 (21%)
2 д/пл 6 (100%)	2 (33%)	2 (33%)	2 (33%)	3 (50%)	2 (33%)	1 (16%)
28 д/пл 3 (6,5%)	2	0	0	3	0	0

Примечание. У — отделяемое из уретры; ППМ — первая порция мочи.

Наиболее поздним маркером инфекционно-воспалительного процесса оказался уровень лейкоцитов в отделяемом из уретры. На 2-й день после окончания лечения повышенное содержание лейкоцитов наблюдалось у 17 (39,5%) человек. Однако в течение последующего периода наблюдения у всех, за исключением 2 пациентов, микроскопическая картина пришла в норму.

Для контрольного обследования на 28-й день после лечения пришли только 12 пациентов — те, у кого на 2-й день после лечения имелись повышенные уровни лейкоцитов в отделяемом из уретры. К 28-му дню ни клинических, ни лабораторных признаков уретрита, а также наличия генетических маркеров *M. genitalium* у них обнаружено не было.

До начала терапии, как показали результаты исследования, наличие нуклеиновых кислот *M. genitalium* было подтверждено у всех 46 пациентов, принявших участие в исследовании. При этом у всех указанных пациентов нуклеиновые кислоты возбудителя обнаруживались как в отделяемом из уретры, так и в ППМ. Результаты по динамике микробиологического ответа, представленные в табл. 1, свидетельствовали, что примерно у 1/3 пациентов элиминация нуклеиновых кислот *M. genitalium* происходит к 3-му дню терапии, а к 8-му дню лечения маркеры *M. genitalium* отсутствовали у 77% пациентов. На 2-й день после окончания лечения только у 6 (13%) пациентов определялись нуклеиновые кислоты возбудителя.

Результаты оценки динамики элиминации ДНК и рРНК *M. genitalium* в разных типах клинического материала представлена в табл. 2. Следует отметить, что до начала лечения в обоих типах клинического материала — и в отделяемом из уретры, и в ППМ — обнаруживались оба типа нуклеиновых кислот *M. genitalium*. В процессе лечения на разных сроках оказалась высока доля пациентов, у которых нуклеиновые кислоты обнаруживаются только в каком-то одном типе клинического материала — либо в отде-

ляемом из уретры, либо в ППМ. Среди пациентов, ответивших на лечение, оказалась высокой доля тех, у кого в ППМ продолжала выявляться ДНК, в то время как при тестировании отделяемого из уретры результаты ПЦР были отрицательными.

Общий анализ динамики клинических, лабораторных и генетических маркеров инфекции, вызванной *M. genitalium*, позволил установить, что из 49 пациентов, включенных в исследование, клинический и микробиологический эффект был достигнут у 46. Рецидив инфекции был установлен у 3 пациентов на разных сроках после окончания терапии: от 2 до 14 дней. В эти сроки у пациентов возобновились жалобы, сопровождающиеся выделениями из уретры и повышением уровня лейкоцитов в отделяемом из уретры. Молекулярно-биологический анализ также подтвердил наличие нуклеиновых кислот *M. genitalium*.

В процессе анализа неудачи терапии 3 пациентам было назначено исследование секрета предстательной железы и УЗИ, которые позволили выявить у одного из них признаки простатита. В настоящее время мы не можем исключить простатит и у других инфицированных лиц на момент назначения терапии, тем не менее мы сочли правильным исключить из анализа оценки эффективности препарата указанного пациента и ограничиться только анализом результатов по пациентам с неосложненными формами инфекции, ассоциированной с *M. genitalium*. В результате клиническая и микробиологическая эффективность терапии джозамицином составила 46/48 (95,8%).

Обсуждение

В своей работе мы впервые в практике лабораторного исследования на *M. genitalium* предложили достаточно строгую микробиологическую оценку эффективности лечения — исследовали оба типа нуклеиновых кислот возбудителя и 2 типа клиниче-

ского материала. Обнаружение какого-либо из маркеров *M. genitalium* (ДНК или рРНК) в отделяемом из уретры или моче мы рассматривали в пользу имеющейся инфекции.

Целесообразность такого подхода основана на следующем. Оба метода ПЦР и НАСБА обладают максимально высокой чувствительностью и специфичностью при диагностике ряда инфекций в целом и для выявления *M. genitalium* в частности. В то же время НАСБА имеет существенное отличие от ПЦР: в качестве мишени используются одноцепочечные молекулы рРНК. В этом случае исходное количество мишеней для НАСБА в сотни и тысячи раз больше, чем для ПЦР, что позволяет рассчитывать на более высокую аналитическую чувствительность. В рамках разработки и лабораторных испытаний нами было установлено, что с помощью НАСБА можно было обнаружить возбудитель как минимум в 10 раз меньшей концентрации, чем методом ПЦР. В нашем исследовании именно методом НАСБА удалось подтвердить наличие возбудителя у одного из пациентов с рецидивом инфекции, у которого плотность обсемененности *M. genitalium* была столь низка, что не обнаруживалась методом ПЦР.

Вторым важным обстоятельством является то, что РНК, как хорошо известно, в отличие от ДНК являются менее стабильными молекулами и значительно быстрее разрушаются при гибели клеток, в том числе под действием антибактериальных препаратов. Это дает основание рассматривать положительные результаты НАСБА как более точный маркер наличия инфекции, по крайней мере, при лечении. В работе [6] было показано, что при лечении пациентов с *C. trachomatis* доксициклином ДНК возбудителя обнаруживалась на 2 нед позже после элиминации РНК. Наши исследования позволили выявить у определенной группы пациентов на 3-й и 8-й день лечения рРНК, определяющуюся в том случае отрицательного анализа на ДНК возбудителя. Однако в нашем случае общая скорость элиминации нуклеиновых кислот была высокой, и уже на ранних сроках после лечения возбудитель не обнаруживался, что демонстрирует высокий антибактериальный эффект *джозамицина*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Европейские стандарты диагностики и лечения заболеваний, передаваемых половым путем. М 2006.
2. Falk, Fredlund H., Jensen J.S. Tetracycline treatment does not eradicate *Mycoplasma genitalium*. Sex Transm Infect 2004; 79: 318–319.
3. Gambini D., Declava I., Lupicia L. et al. *Mycoplasma genitalium* in males with nongonococcal urethritis: prevalence and clinical efficacy of eradication. Sex Transm Infect 2000; 27: 226–229.
4. Bradshaw C., Jensen J.S., Tabrizi S.N. et al. Azithromycin failure in *Mycoplasma genitalium* urethritis. Emerg Inf Dis 2004; 12: 149–152.
5. Бурицев О.А., Гуцин А.Е., Гомберг М.А. Клинические особенности течения и лечения уретрита у мужчин, вызванного *Mycoplasma genitalium*. Рос журн кож вен бол 2008; 5: 1–5.
6. Morré S.A., Sillekens P.T., Jacobs M.V. et al. Monitoring of Chlamydia trachomatis infections after antibiotic treatment using RNA detection by nucleic acid sequence based amplification. Mol Pathol 1998; 51: 149–154.
7. Jensen J.S., Bjornelius E., Dohn B. et al. Comparison of First Void Urine and Urogenital Swab Specimens for Detection of *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis* by Polymerase Chain Reaction in Patients Attending a Sexually Transmitted Disease. Clin Sex Transm Dis 2004; 31: 499–507.

Второй важной особенностью нашей работы было исследование двух типов клинического материала — отделяемого из уретры — основного вида клинического материала, исследуемого у мужчин в нашей стране при диагностике урогенитальных инфекций, и ППМ. Основанием для включения ППМ в исследование послужила работа [7], в которой на значительном клиническом материале было продемонстрировано, что при первичном обследовании пациентов на *M. genitalium* исследование ППМ позволило выявить большее число инфицированных. В нашем исследовании у всех пациентов до начала лечения обоими методами (ПЦР и НАСБА) были получены положительные результаты как в соскобном отделяемом из уретры, так и в моче, а в процессе терапии число пациентов с отрицательными результатами ПЦР и НАСБА в соскобе и положительными в моче было выше, чем число тех, у кого нуклеиновые кислоты обнаруживались в соскобе и не обнаруживались в ППМ.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что в случае диагностики *M. genitalium* идеальным вариантом является исследование обоих типов клинического материала; если все же предстоит делать выбор в пользу одного из материалов, то ППМ следует рассматривать как имеющий предпочтение. Однако при этом необходимо отметить, что обязательным условием является высокая аналитическая чувствительность молекулярного теста для ППМ, поскольку в моче содержится большее, чем в соскобе, количество ингибиторов ПЦР, требующее высокоэффективных методик экстракции нуклеиновых кислот. Тест-системы, которые мы использовали в своей работе, как раз и соответствовали этим требованиям.

Полученные результаты объективно отражают высокую эффективность *джозамицина* при лечении инфекции, вызванной *M. genitalium*, исходя из высокой скорости элиминации возбудителя в процессе лечения. Из 48 пациентов с неосложненной инфекцией, вызванной *M. genitalium*, клинический и микробиологический ответ был получен у 46 (95,8%).