

## Изучение распространенности возбудителей ИППП (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*) с помощью ПЦР в реальном времени в формате «МУЛЬТИПРАЙМ»

А.Е. ГУШИН<sup>1</sup>, П.Г. РЫЖИХ, Ю.А. САВОЧКИНА, О.Ю. ШИПУЛИНА, Г.А. ШИПУЛИН

ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

### Investigation the prevalence of the causative agents of STI (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*) by real-time PCR using the MULTIPRIME system

A.E. GUSHCHIN, P.G. RYZHIKH, YU.A. SAVOCHKINA, O.YU. SHIPULINA, G.A. SHIPULIN

Federal State Budgetary Institution of Science Central Research Institute of Epidemiology, Russian Federal Consumer Rights Protection and Human Health Control Service, Moscow

*Ключевые слова:* инфекции, передаваемые половым путем, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, полимеразная цепная реакция в реальном времени, формат «МУЛЬТИПРАЙМ».

*Key words:* sexually transmitted infections, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, real-time polymerase chain reaction, MULTIPRIME system.

Инфекционно-воспалительные заболевания уrogenитального тракта — одна из основных причин нарушения репродуктивной функции человека. Из многообразия микроорганизмов, способных вызывать такие заболевания, в первую очередь следует выделить те, этиологическая роль которых считается доказанной. Речь идет о таких возбудителях, как *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, относящихся к группе инфекций, передаваемых половым путем (ИППП). В последние годы накопилось большое количество данных, свидетельствующих о самостоятельной этиологической роли *Mycoplasma genitalium*. В частности, в последних работах С. Gaydos [1, 2] показано, что *M. genitalium* — вторая по частоте после *C. trachomatis* причина уретритов у мужчин, а при цервицитах в обследованной группе женщин *M. genitalium* находилась на первом месте. Долгое время основной причиной воспалительных заболеваний органов малого таза, трубного бесплодия, эпидидимита и орхита считали хламидии и гонококки. В работах последних лет показано, что значительную роль при этих осложнениях играет *M. genitalium* [3]. В настоящее время этот микроорганизм подавляющее большинство зарубежных специалистов рассматривают как безусловно-патогенный, что обуславливает необходи-

мость включить его в перечень потенциальных этиологических агентов при дифференциальной диагностике ИППП.

В последние годы основу лабораторной диагностики многих стран мира составляют методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), из которых в нашей стране наиболее известным является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Принятые недавно Европейские протоколы [4–7] ведения больных с ИППП для обнаружения *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* рекомендуют использовать в лабораторной диагностике современные МАНК.

В ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора разработаны тесты на основе ПЦР для отдельных возбудителей ИППП. Проведен ряд исследований [8–11], результаты которых свидетельствуют о преимуществе аналитических характеристик разработанных ПЦР-тестов над классическими рутинными тестами. Появление современных вариантов МАНК, в частности ПЦР в реальном времени, в сочетании с возможностью использовать современное оборудование позволило одновременно проводить амплификацию и детекцию ДНК нескольких микроорганизмов. Нами разработан тест на основе мультиплексной ПЦР в реальном времени —

«АмплиСенс-*N. gonorrhoeae/C. trachomatis/M. genitalium/T. vaginalis* — МУЛЬТИПРАЙМ-FL» для одновременного выявления четырех наиболее значимых патогенных возбудителей ИППП.

Цель нашего исследования — изучение с помощью разработанного теста распространенности возбудителей ИППП — *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *T. vaginalis* — среди пациентов медицинских центров Москвы.

## Материал и методы

В период с 2010 по 2011 г. в Центр молекулярной диагностики ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (ЦМД ЦНИИЭ) был направлен клинический материал из разных лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ) Москвы для исследования одновременно на четыре возбудителя ИППП — *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* методом ПЦР в реальном времени. Вели прием пациентов и получали клинический материал врачи разных специальностей: дерматовенерологи, гинекологи, урологи, а также врачи смежных специальностей, ведущие пациентов с патологией органов репродукции. Клиническим материалом являлись мазок из влагалища, соскоб из цервикального канала.

### Молекулярно-биологическое исследование

Из полученных клинических образцов выделяли ДНК с помощью набора ДНК-сорб-АМ. Дальнейшее исследование выделенных препаратов ДНК проводили с использованием набора реагентов для ПЦР в реальном времени «АмплиСенс-*N. gonorrhoeae/C. trachomatis/M. genitalium/T. vaginalis* — МУЛЬТИПРАЙМ-FL» согласно инструкции. Данный набор реагентов включает пары праймеров и флуоресцентно-меченые гибридационные зонды, специфичные к ДНК четырех указанных микроорганизмов, а также к ДНК внутреннего контрольного образца. При наличии в пробе ДНК одного или нескольких исследуемых возбудителей происходят амплификация и детекция их специфических фрагментов. ПЦР в реальном времени проводили с помощью приборов RotorGen-6000 и RotorGen-Q («Quiagen», Германия).

## Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных показал, что в общей сложности за указанный период с использованием теста «АмплиСенс-*N. gonorrhoeae/C. trachomatis/M. genitalium/T. vaginalis* — МУЛЬТИПРАЙМ-FL» были обследованы 8115 пациентов (83,9% женщин, 16,1% мужчин) в возрасте 18—45 лет. Материал был получен в 35 клиниках Москвы. Частота выявления возбудителей значительно варьировала между разными клиниками и находилась в пределах 2,8—24%. Следует отметить, что данные ЛПУ не входят в со-

став кожно-венерологической службы и являются многопрофильными медицинскими центрами. Результаты анализа распространенности ИППП среди обследованных мужчин и женщин свидетельствуют о том, что доля инфицированных мужчин (11,6%) была выше, чем женщин (6,8%), хотя мужчины составили всего 1/6 всех обследованных. Дальнейший анализ позволил определить соотношение тех или иных возбудителей ИППП среди инфицированных пациентов. Наиболее распространенной среди мужчин и женщин является хламидийная инфекция, доля которой у мужчин по сравнению с другими ИППП в 1,2 раза выше (рис. 1, 2). Второй по частоте встречаемости у лиц обоих полов является инфекция, вызванная *M. genitalium*, которая у обследованных женщин обнаруживалась 1,5 раза чаще, чем у мужчин. Наибольшими различия между мужчинами и женщинами были по частоте выявления *N. gonorrhoeae* и *T. vaginalis*. У женщин *T. vaginalis* была третьим по частоте возбудителем ИППП, в то время как на третьем месте у мужчин выявлялся возбудитель *N. gonorrhoeae*.

Примерно в одинаковом долевым соотношении, как у мужчин, так и у женщин, встречались микстинфекции, вызванные данными возбудителями (рис. 3, 4). Однако у женщин зарегистрировано 9 разных комбинаций, включая случаи инфицирования одновременно тремя патогенными возбудителями, тогда как у мужчин зафиксированы 3 варианта сочетания возбудителей. Второй по встречаемости комбинацией возбудителей у женщин была *C. trachomatis* + *T. vaginalis*, у мужчин — *C. trachomatis* + *N. gonorrhoeae*.

В задачи данного исследования не входил анализ клинического статуса пациентов. На данном

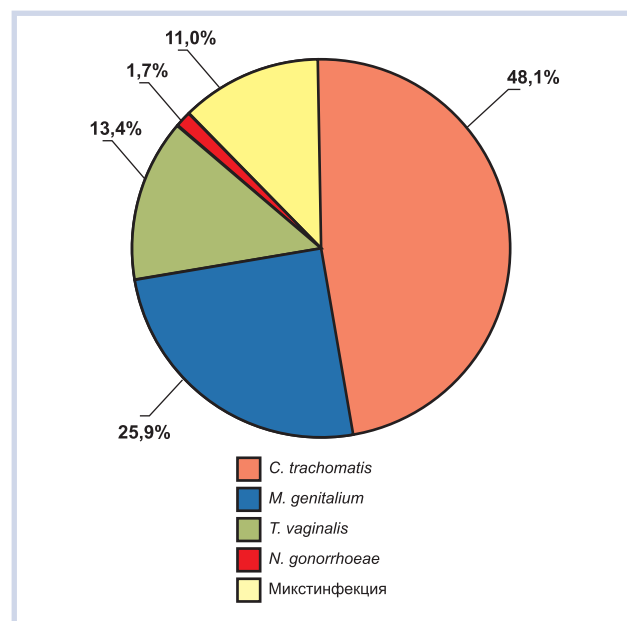


Рис. 1. Соотношение выявленных возбудителей среди женщин (n=464).

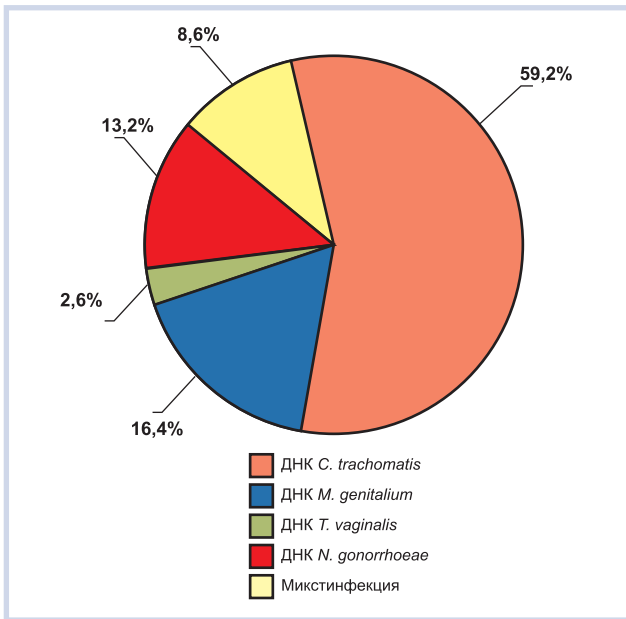


Рис. 2. Соотношение выявленных возбудителей среди мужчин (n=152).

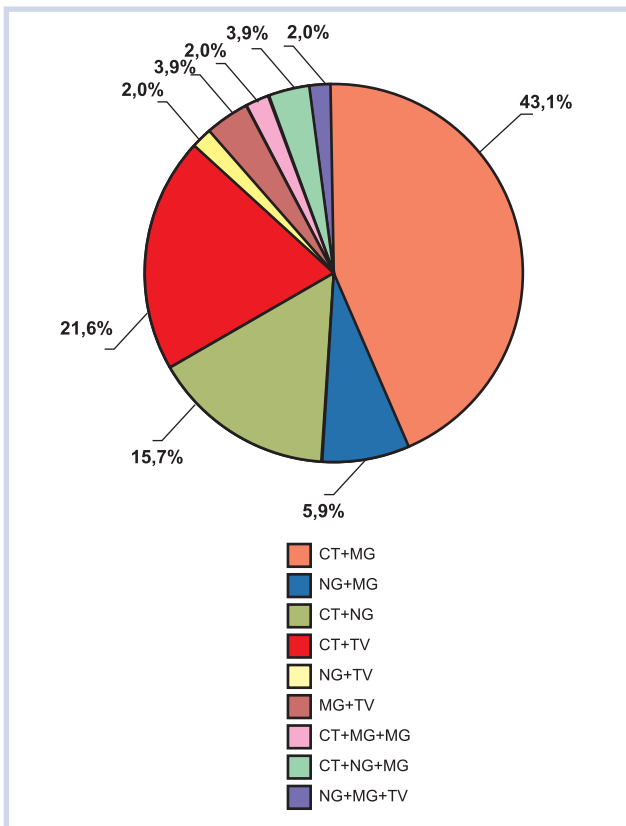


Рис. 3. Соотношение комбинаций возбудителей при микстинфекциях у женщин (n=51).

NG — *Neisseria gonorrhoeae*, CT — *Chlamydia trachomatis*, TV — *Trichomonas vaginalis*, MG — *Mycoplasma genitalium*.

этапе исследования нас интересовала феноменология распространенности основных патогенных возбудителей урогенитальных инфекций. Это имеет важное значение, учитывая сложившуюся в нашей

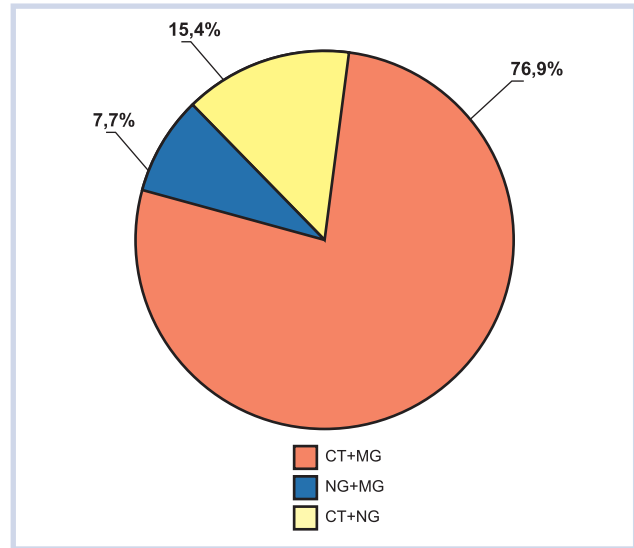


Рис. 4. Соотношение комбинаций возбудителей при микстинфекциях у мужчин (n=13).

CT — *Chlamydia trachomatis*, MG — *Mycoplasma genitalium*, NG — *Neisseria gonorrhoeae*.

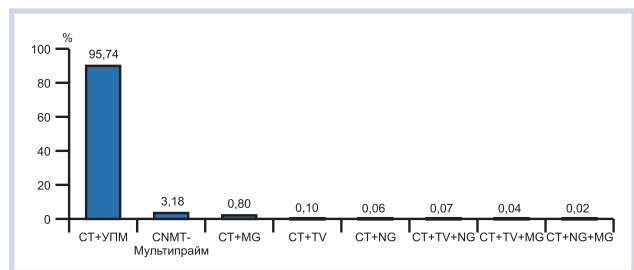


Рис. 5. Комбинации проведенных ПЦР-исследований на урогенитальные инфекции (n=154 272).

NG — *Neisseria gonorrhoeae*, CT — *Chlamydia trachomatis*, TV — *Trichomonas vaginalis*, MG — *Mycoplasma genitalium*

стране практику назначения лабораторных исследований. Мы провели анализ назначений на ПЦР-исследования в разных медицинских центрах Москвы, включая те, которые уже упоминались. За 2010 г. в ЦМД ЦНИИЭ были исследованы клинические образцы, полученные от 154 272 пациентов (78,4% женщин, 21,6% мужчин), в которых одним из тестируемых возбудителей была *C. trachomatis*. Установлено, что в исследованиях на урогенитальные инфекции методом ПЦР основную долю (более 95%) составляют те, в которых, помимо *C. trachomatis*, тестируются условно-патогенные микроорганизмы, прежде всего *M. hominis*, *Ureaplasma*, *G. vaginalis*, *Candida* и др. (рис. 5). Мы подчеркиваем, что речь идет о методе ПЦР в качественном формате, основное преимущество которого — высокая чувствительность — является спорным достоинством для диагностики условно-патогенной флоры. И наоборот, доля назначений на исследования, в которых, помимо хламидий, фигурировали бы другие клинически значимые патогенные возбудители, была менее 5%.

Такая диспропорция не может не отразиться не только на учете и регистрации случаев заболевания, но и на выборе адекватной тактики лечения. Причины этого имеют как объективный, так и субъективный характер.

Объективными причинами последнего тезиса являются устаревшая и противоречивая нормативно-правовая база, отсутствие современных стандартов, регламентирующих применение в лабораторной практике молекулярных методов, в частности ПЦР, в то время как в большинстве развитых стран мира основными методами диагностики ИППП являются молекулярно-биологические. В то же время в нашей стране достаточно давно выпускаются коммерческие тест-системы на базе методов ПЦР и НАСБА, которые прошли процедуру государственной регистрации и разрешены к использованию в лабораторной практике. К субъективным причинам следует отнести часто необоснованное предубеждение клиницистов в отношении молекулярных методов, низкую информированность об их преимуществах.

## Заключение

Исторически диагностикой и лечением ИППП в Российской Федерации занимается кожно-венерологическая служба, организационно представленная системой кожно-венерологических дис-

пансеров. Однако в результате изменения законодательства в последние годы стало создаваться большое количество многопрофильных медицинских центров, занимающихся в том числе и вопросами репродуктивного здоровья и имеющих в штате специалистов дерматовенерологического, гинекологического и урологического профиля. В связи с этим необходим единый стандартизированный подход к ведению пациентов с инфекционной патологией органов репродукции. За последние 5 лет разработаны тесты нового поколения, основанные на ПЦР в реальном времени, обладающие по сравнению с классическими тестами более высокой чувствительностью, специфичностью и объективностью полученных результатов. В сочетании с современным оборудованием эти тесты позволяют обнаруживать ДНК нескольких микроорганизмов в одной реакции. Впервые в нашей стране был разработан тест на основе мультиплексной ПЦР в реальном времени — «*Amplicon-N. gonorrhoeae/C. trachomatis/M. genitalium/T. vaginalis* — МУЛЬТИПРАЙМ-FL», позволяющий с высокой эффективностью выявлять ДНК одновременно четырех ключевых возбудителей ИППП в процессе одной реакции. Выявление данных микроорганизмов должно являться базовой диагностической процедурой при обследовании пациентов с инфекционно-воспалительной патологией репродуктивных органов, а также при проведении профилактических обследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Gaydos C., Maldeis N.E., Hardick A. et al. Mycoplasma genitalium compared to chlamydia, gonorrhoeae and trichomonas as an aetiological agent of urethritis in men attending STD clinics. *Sex Transm Infect* 2009;85:6:438—440.
2. Gaydos C., Maldeis N.E., Hardick A. et al. Mycoplasma genitalium as a contributor to the multiple etiologies of cervicitis in women attending sexually transmitted disease clinics. *Sex Transm Dis* 2009;36:10:598—606.
3. McGowan C. L., Anderson-Smits C. Mycoplasma genitalium: an emerging cause of sexually transmitted disease in women. *PLoS Pathog* 2011;7:5:t1001324.
4. Lanjouw E., Ossewaarde J.M., Stry A. et al. 2010 European guideline for the management of Chlamydia trachomatis infections. *Int J STD AIDS* 2010;21:11:729—737.
5. Bignell C. (IUSTI/WHO). European (IUSTI/WHO) guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoeae in adults. *Int J STD AIDS* 2009;2:7:0:453—457.
6. Shahmanesh M., Moi H., Lassau E., Janier M.: IUST/WHO. 2009 European guideline on the management of male non-gonococcal urethritis. *Int J STD AIDS* 2009;20:7:458—464.
7. Sherrard J., Donders G., White D. 2009 European (IUSTI/WHO) Guideline on the Management of Vaginal Discharge in women of reproductive age. [http://www.iusti.org/regions/europe/Draft\\_Euroguideline\\_vaginaldischarge\\_2009.pdf](http://www.iusti.org/regions/europe/Draft_Euroguideline_vaginaldischarge_2009.pdf)
8. Шипицына Е.В. Воробьева Н.Е., Савичева А.М. и др. Применение метода NASBA для диагностики урогенитальной хламидийной инфекции. *Журн акуш и жен бол* 2005;54:4:17—21.
9. Цеслок М.В., Гуцин А.Е., Савочкина Ю.А. и др. Сравнение методов лабораторной диагностики Neisseria gonorrhoeae с применением «расширенного золотого стандарта». *Клин лаб диагност* 2008;7:48—52.
10. Гуцин А.Е., Бурцев О.А., Рыжих П.Г. и др. Мониторинг лечения пациентов с инфекцией, вызванной Mycoplasma genitalium с помощью методов ПЦР и НАСБА в реальном времени. *Клин дерматол и венерол* 2009;4:58—63.
11. Рыжих П.Г., Гуцин А.Е., Савочкина Ю.А. Сравнительная оценка методов микроскопии (нативного и окрашенного препаратов) и амплификации нуклеиновых кислот (ПЦР и НАСБА в реальном времени) при обнаружении Trichomonas vaginalis. *Клин дерматол и венерол* 2011;2:28—35.