

## ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ

Карагандинский государственный университет им. Е.А.Букетова, Казахстан

Инфекционные болезни на протяжении многих столетий были и остаются наиболее опасными болезнями человеческого организма из-за их способности вовлечь в процесс большое число здоровых людей в течение короткого периода времени.

Появляются новые виды инфекционных возбудителей (госпитальные штаммы бактерий, вириды), происходит изменение макроорганизма, претерпевают существенные изменения условия жизни под действием экологических и социальных факторов, что оказывает существенное влияние на распространенность, течение и исход инфекционных болезней. Поэтому необходимо следить за современными достижениями медицины и биологии, которые обеспечивают новые возможности определения болезнетворных агентов [1].

Бактериальная инфекция - это заражение живых организмов микроорганизмами - бактериями [2].

Способность бактерий вызывать инфекционные болезни называется патогенностью. Опасность патогенных видов бактерий заключается в том, что они в процессе своей жизнедеятельности выделяют вещества, которые для человека (или животного) являются токсичными. А учитывая высокую скорость размножения бактерии, концентрация токсичных веществ увеличивается в короткие сроки [3].

В данной статье будут рассмотрены некоторые бактериальные агенты, вызывающие, преимущественно, инфекционные заболевания урогенитального тракта и передающиеся половым путем, а также основные способы их определения для выявления наиболее точного и достоверного метода, не требующего больших материальных и временных затрат.

### **Определение *Chlamydia trachomatis***

*Chlamydia trachomatis* – облигатный внутриклеточный паразит, поражающий слизистые оболочки человека и животных, основной возбудитель одного из самых распространенных заболеваний, передающихся половым путем - хламидиоза [4].

Заражение хламидиозами обычно происходит половым путём. Дети могут инфицироваться при прохождении плода через родовые пути матери, больной хламидиозом. Также возможен контактно-бытовой путь передачи [5].

Главными трудностями при выявлении хламидий оказываются их малые размеры, а также неспособность расти на искусственных питательных средах. Материалом для анализа на хламидии может стать соскоб эпителия кровь, моча и сперма у мужчин [6].

Диагностика хламидийной инфекции осуществляется следующими методами:

**1. Микроскопический анализ (общий мазок).** При этом виде обследования у мужчин берётся мазок из уретры, у женщин - мазки одновременно из влагалища, шейки матки и наружного отверстия мочеиспускательного канала. Это один из самых старых методов, однако, он до сих пор не утратил своего значения. Основой метода является окрашивание мазков по Романовскому-Гимза для обнаружения цитоплазматических включений хламидий в эпителиальных клетках препаратов [3,7].

Метод является доступным, недорогим, однако имеет низкую чувствительность и позволяет диагностировать около 15% случаев хламидийной инфекции у больных мужчин и у 40% женщин при больших временных затратах. Данный метод может быть рекомендован при технической невозможности применения других методов [8].

**2. Метод прямой иммунофлюоресценции (ПИФ)** с использованием моноклональных антител против основного белка наружной мембраны (МOMP) *Chlamydia trachomatis* — является в настоящее время одним из основных методов диагностики. Моноклональные антитела отличаются друг от друга по яркости флюоресценции, постоянству выявляемых форм элементарных телец и степени специфичности [9].

Диагностическая информативность ПИФ связана с тем, что с ее помощью выявляются не только корпускулярные, но и растворимые антигены хламидий. ПИФ-метод является важнейшим скрининговым методом диагностики урогенитального хламидиоза. Его чувствительность и специфичность при использовании моноклональных антител составляет 70-85% [5, 12].

Недостатком метода является то, что само обнаружение наружной мембраны хламидий ещё не является доказательством наличия жизнеспособного организма. Это следует учитывать при установлении излеченности от хламидиоза. Бывают случаи ложноположительных результатов, когда вместо хламидии высвечиваются стафилококки. Кроме того, метод ПИФ недостаточно чувствительный при асимптомной и вялотекущей инфекции [7, 12].

**3. Методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК)** превосходят по своей чувствительности (свыше 90 %) другие диагностические методы, включая культуральный, и позволяют обнаруживать минимальное количество элементарных телец *S. trachomatis*. К методам МАНК относятся метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) и лигазной цепной реакции (ЛЦР) [3, 6].

При использовании метода ПЦР для обнаружения *S. trachomatis* исследуются уретральные и цервикальные соскобы, моча. Основными мишенями являются нуклеотидная последовательность видоспецифической криптической плазмиды, последовательность генома главного белка внутренней мембраны, рибосомальные гены [11, 13]

Основные преимущества метода ПЦР в диагностике хламидиоза (хламидий): высокая чувствительность и специфичность; неинвазивность и простота сбора проб; простые требования к условиям транспортировки и хранения; возможность скрининга больших популяций; скрининг бессимптомной инфекции; постановка реакции в полуавтоматическом режиме и быстрота получения результатов, точность метода 94-98 % [12, 13]

На сегодняшний день, безусловно, это наиболее чувствительный метод диагностики генитальной хламидийной инфекции [3].

Лигазная цепная реакция (ЛЦР) - это второй молекулярно-биологический метод выявления хламидиоза (хламидий), включающий последовательные циклы лигирования (соединения) четырех олигонуклеотидных зондов, комплементарных цепям ДНК-матрицы. ЛЦР может быть использована для анализа уретральных, эндоцервикальных образцов и проб мочи, представляя собой неинвазивный метод скрининга для выявления *S. trachomatis*.

ЛЦР явилась первой методикой, обладающей повышенной чувствительностью определения *S. trachomatis* в моче у женщин. Чувствительность и специфичность метода составляет 94,7% и 99,8% соответственно по сравнению с культуральным методом [3, 9].

**4. Метод иммуноферментного анализа (ИФА)** основан на определении антител (IgG, IgA, IgM) к хламидиям в крови. Антитела к хламидиям выявляются при взаимодействии со специальными препаратами, содержащими хламидийные антигены, образующие с антителами прочный комплекс, который можно обнаружить разными способами. Помимо обычных соскобов, для проведения анализа методом ИФА берется и кровь [12, 14].

Достоинства ИФА заключаются в простоте транспортировки и хранения полученных материалов, объективности оценки результатов, возможности автоматизации и одновременного исследования множества проб. Его недостатком является невозможность исключения ложноположительной реакции, сложность контроля за качеством исследований, высокая стоимость аппаратуры, меньшая чувствительность метода, чем реакция прямой иммунофлюоресценции (ПИФ) с моноклональными антителами или ПЦР [3].

Таким образом, с практической точки зрения наиболее удобными, информативными, быстрыми по исполнению методами диагностики хламидийной инфекции можно считать метод ПЦР и ПИФ (прямой иммунофлюоресценции) с моноклональными антителами. Методы молекулярной амплификации (ПЦР, ЛЦР) являются средством массового скрининга пациентов для обнаружения *S. trachomatis*. Метод ПЦР — наиболее чувствительный некультуральный метод диагностики хламидийной инфекции. Наименее точным является метод микроскопического анализа.

#### **Определение *Mycoplasma genitalium* и *Mycoplasma hominis***

*Mycoplasma genitalium* и *Mycoplasma hominis* относятся к семейству Mycoplasmataceae (порядок *Mycoplasmatales* класса *Mollicutes*). Это семейство разделяется на 2 рода: *Mycoplasma* и *Ureaplasma* [15].

*Mycoplasma genitalium* и *Mycoplasma hominis* являются возбудителями мочеполового микоплазмоза — острого или хронического инфекционного заболевания, которое в настоящее время занимает значительное место среди заболеваний, передающихся половым путем [16].

Определение микоплазм достаточно сложно, поскольку отсутствие четких морфологических характеристик, а также полиморфизм, присущий всему семейству микоплазм, исключает возможность идентификации возбудителя в мазках от больных, поэтому цитологический метод не используется. Еще одна сложность заключается в том, что диагностика *M. genitalium* невозможна с

использованием методов, традиционно применяемых для выявления других возбудителей ИППП – микроскопии, вследствие чрезвычайно малых размеров возбудителя; бактериологического посева, вследствие низкой скорости деления клеток микоплазм и высоких требований к составу сред; ИФА вследствие того, что *M. genitalium* обладает низкими иммуногенными свойствами, а, кроме того несет родовые антигены, встречающиеся у других представителей молликут, колонизирующих человеческий организм. В связи с этим, единственными доступными методами лабораторной диагностики инфекции, вызванной *M. genitalium* являются методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) [3, 17].

В настоящее время диагностика микоплазмоза, вызываемого видами *M. hominis* и *M. genitalium* может осуществляться следующими методами:

**1) Культуральный метод** (применителен только в отношении *M. hominis*) - это самый точный, но при этом и самый длительный метод диагностики. Этот метод позволяет не только подращивать урогенитальные микоплазмы на селективных средах, но и оценивать количественное содержание микоплазм в исследуемом материале.

Посев исследуемого материала обычно производят на плотную или жидкую питательные среды. В качестве исследуемого материала используется вагинальное отделяемое, материал из цервикального канала шейки матки, уретры, а также околоплодные воды, плацента, слизь из носоглотки [18].

Также *M. hominis* имеет уникальную внутриклеточную ферментную систему и способна гидролизовать аргинин с помощью трех ферментов (аргининдезаминазы, орнитинтранскарбамилазы и карбаматкиназы) до аммиака. При этом образуется ион аммония, и происходит защелачивание среды. Вследствие этого изменяется цвет (с желтого на красный) индикатора кислотности среды, что позволяет визуализировать реакцию [15,17].

Рост микоплазмы в культуре составляет 48 часов, специфичность и чувствительность набора составляет 100 и 98% соответственно. Культуральный метод позволяет осуществлять контроль эффективности назначенной терапии в динамике и идентифицировать только живых возбудителей [19].

**2) Метод иммуноферментного анализа** (также применителен только в отношении *M. hominis*) - основан на выявлении специфических антител, вырабатываемых в ответ на внедрение инфекционного антигена [20].

Обнаружение антител класса А свидетельствует об острой фазе заболевания, требующей активного лечения в начальной стадии инфекции [15].

Титры антител IgM и IgG необходимо определять в острый период заболевания и через 2-4 недели (метод парных сывороток). Повышенный уровень IgM является достоверным индикатором микоплазменной инфекции у детей. Титр IgG выше 1:10 и/или 4-кратное увеличение титра IgG в парных сыворотках указывают на текущую инфекцию. Значительное увеличение уровня IgG наблюдается при реинфекции [17, 18].

Преимуществами метода ИФА является высокая чувствительность (90%); быстрота проведения диагностической реакции; небольшая стоимость диагностических наборов; возможность ранней диагностики инфекции; легкость в отслеживании динамики развития процесса инфекционного

заболевания. Недостаток - относясь к непрямые методам диагностики, он выявляет иммунный ответ организма на возбудителя, а не самого возбудителя, что позволяет определить его как вспомогательный способ диагностирования микоплазмоза [3].

**3) Метод ПЦР.** Наиболее современный и достоверный (точность диагностики составляет 99%) метод диагностики *Mycoplasma genitalium* и *Mycoplasma hominis*. Пробой для ПЦР-диагностики микоплазмы может быть соскоб эпителиальных клеток и отделяемое урогенитального тракта, секрет простаты, мокрота, синовиальная жидкость, моча и др. [1, 18].

Достоинствами метода являются:

- возможность использования разнообразного биологического материала в зависимости от места предполагаемой локализации возбудителя;
- выявление генетического материала в малом количестве пробы;
- возможность ранней диагностики заболеваний и выявления бессимптомных форм инфекции;
- требования к забору биологического материала, условия его хранения и транспортировки значительно упрощены по сравнению с бактериологическим методом, поскольку нет необходимости сохранять возбудителя в живом виде;
- высокая скорость проведения анализа [21, 22].

Таким образом, в связи с проблематичностью диагностики *M. genitalium*, вышеописанными сложностями проведения культурологических исследований и недостатками метода иммуноферментного анализа, наиболее точным и доступным методом определения микоплазмоза является ПЦР.

### **Определение *Ureaplasma urealyticum* и *Ureaplasma parvum***

*Ureaplasma* — грамтрицательные коккобактерии, относятся к семейству микоплазм. По своим свойствам уреоплазма занимает промежуточное положение между вирусами и одноклеточными микроорганизмами [2].

Ранее ученые выделяли два подвида (биовара) *Ureaplasma urealyticum*: PARVO (серотипы 1, 3, 6 и 14) и T-960 (серотипы 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13). Однако в настоящее время эти биовары считаются двумя самостоятельными видами: *Ureaplasma parvum* и *Ureaplasma urealyticum* [23].

Уреоплазмоз - это инфекционное заболевание, характеризующееся поражением мочеиспускательного канала, предстательной железы, влагалища. Инфицирование происходит преимущественно половым путем. Также имеет место внутриутробное инфицирование плода и заражение новорожденных при прохождении через инфицированные родовые пути матери [3].

Для определения уреоплазм используются несколько разных методов:

**1) Культуральный метод** - самый точный из всех известных методов анализа на уреоплазмы. После посева материала на питательную среду образуются мелкие колонии черного или темно-коричневого цвета [3, 24].

Урогенитальные микоплазмы различных видов имеют уникальные внутриклеточные ферментные системы. Так, *Ureaplasma urealyticum* продуцирует фермент уреазу, с помощью которой гидролизует мочевины до аммиака, меняя рН среды с 6,0 до 7,5 и окраску среды с желтой на розовую. Эта способность закислять жидкую питательную среду позволяет

проводить оценку результатов анализа на уреаплазмоз визуально по изменению цвета рН-индикаторов в процессе роста уреаплазм [20, 24].

Определение количества уреаплазм по интенсивности цвета индикатора осложняется тем, что уреаплазмы имеют разную активность уреазы. Более того, уреазной активностью (способностью разлагать мочевины) могут обладать и ряд других микроорганизмов [25].

**2) Иммуноферментный анализ (ИФА).** Данный метод позволяет выявить антитела к структурам уреаплазмы. Специфические иммуноглобулины классов А, М, G вырабатываются организмом в ответ на свежее (IgA), недавнее (IgM) заражение уреаплазмами и длительное (IgG) носительство уреаплазм [30].

Повышение титра антител может косвенно свидетельствовать об активности инфекции. Таким образом, ИФА свидетельствует о состоянии иммунитета, т.е. косвенно о наличии уреаплазм во всем организме. Точность метода составляет 80-86% [30, 31].

Следует учитывать, что продукция антител не всегда носит выраженный характер, и в этом случае прибегают к другим методам диагностики. Методы ПЦР и ИФА являются взаимодополняющими [5].

в **Методы, основанные на микроскопии** (реакция непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) и реакция прямой иммунофлюоресценции (РПИФ)). Данные методы позволяют визуально определить наличие антител к уреаплазме в крови пациента. При использовании прямого метода РИФ метят антитела, которые непосредственно участвуют в реакции с исследуемым антигеном, а в случае непрямого метода РИФ с исследуемым антигеном вначале взаимодействуют специфические к нему антитела, а уже с ними взаимодействуют антивидовые антитела (антитела против иммуноглобулинов диагностической сыворотки), меченные флуорохромом [4, 25].

Эти методы являются довольно простыми и доступными, однако они не способны выявлять уреаплазмы в малом количестве и довольно субъективны [26].

**4) Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** – относится к методам ДНК-диагностики и основывается на распознавании последовательности нуклеотидов в генах искомым микроорганизмов или вирусов. Исследуются соскобы из уретры, стенок влагалища и цервикального канала, крови [1].

В случае диагностики *Ureaplasma* методом ПЦР могут определяться участки ДНК, которые являются общими для двух видов *Ureaplasma urealyticum* и *Ureaplasma parvum*, а при их обнаружении пишется, что выявлена *Ureaplasma species* - т.е. родовая уреаплазма (т.к. в пробе есть участки ДНК одного из двух видов или их обоих). Когда стоит вопрос о целесообразности лечения - назначают дополнительное исследование на видоспецифичность, т.е. точную дифференциацию *Ureaplasma urealyticum* от *Ureaplasma parvum* [1, 3].

Таким образом, практически все представленные методы диагностики *Ureaplasma urealyticum*, за исключением микроскопических, обладают достаточно высокой точностью и специфичностью, но для получения более достоверных результатов рекомендуется применять комплексную диагностику.

На основании изложенного можно сделать вывод о том, что, учитывая преимущества и недостатки каждого из описанных методов определения инфекционных агентов бактериальной природы, наиболее эффективными являются культуральный метод и ПЦР. Однако основным недостатком первого метода является длительность проведения анализа. В то же время метод ПЦР обладает большей чувствительностью, специфичностью, отличается быстротой получения результата, возможностью одновременного выявления нескольких инфекционных агентов, а также проведением количественного анализа с помощью Real-time ПЦР.

### Список литературы

1. Савичева А.М., Башмакова М.А., Шипицина Е.В. Клиническая оценка генитальных инфекций. Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний // Материалы 3-ой Всероссийской научно-практической конференции. - М., 2000. - С.79-82.
2. Медицинская микробиология / под редакцией В.И. Покровского. - М: ГО-ЭТАР МЕДИЦИНА, 1998. - 1184 с.
3. В.П.Адаскевич, В.М.Козин. Кожные и венерические болезни. - М.: Мед. лит., 2006. - 672 с.
4. Козлова В.И., Пухнер А.Ф. Вирусные, хламидийные и микоплазменные заболевания гениталий. - М.: ИИД "Филин", 1997. - 536 с.
5. Лобзин Ю.В. Хламидийные инфекции: руководство для врачей. - СПб: ООО «Издательство ФОЛИАНТ», 2003. – 400 с.
6. Башмакова М.А., Бочкарев Е.Г., Говорун В.М. Хламидиоз. Современные подходы к диагностике и лечению. - М., 1999 - 61 с.
7. Савенкова М.С. Хламидийная и микоплазменная инфекции в практике педиатра // Педиатрия. Приложение к журналу Consilium medicum. - 2005. - Т. 7. - № 1. – С. 5-15
8. Кожные и венерические болезни (справочник) / под ред. О.Л.Иванова. - М., Медицина, 2007. – 352 с.
9. Манухин И. Б. Урогенитальный хламидиоз (клиника, диагностика, лечение). Учебное пособие для врачей. - М.: МГМСУ, 2003. - 17 с.
10. Назарова Е. К. Хламидийная инфекция. Цитология. Иммунофлюоресценция. Атлас. - СПб.: Интермедика, 2004 - 80 с.
11. Скрипкин Ю. К., Шарапова Г. Я., Селицкий Г.Д.. Инфекции, передаваемые половым путем. - М.: МЕДпресс-информ, 2001. – 473 с.
12. Кубанова А.А., Васильев М.М., Говорун В.М. Современные подходы к диагностике и терапии латентной хламидийной инфекции // Вестник дерматологии и венерологии. - 2004. - № 3. – С. 6–10.
13. Skulnick M. Use of the PCR for the detection of Chlamydia trachomatis from endocervical and urin spesimen in an asimtomatic low-prevalence population of women // Diagn. Micro-biol. Infect. Dis. - 1994. - № 20. – P. 195-204.
14. Исаков В.А. Дискуссия: диагностика и лечение хламидиоза // Terra Medica nova. - 2000. - № 2. – С. 11–22.

15. Хрянин А.А., Решетников О.В. Современные представления о *Mycoplasma genitalium* // Русский медицинский журнал. - 2008. - Т. 16. - № 19. - С. 1236–1237.
16. Прилепская В.Н., Кисина В.И., Соколовский Е.В. К вопросу о роли мико-плазм в урогенитальной патологии // Гинекология. - 2007. - Т. 9. - № 1. - С. 7-9.
17. Koch A., Bilina A., Teodorowicz L. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients with sexually transmitted diseases // Wien Klin Wochenschr. - 1997. – V. 109. - P. 584-589.
18. Бенькович А.С. Инфекции, вызываемые *Mycoplasma hominis*: клинические проявления, особенности диагностики и терапии // Клиническая дерматология и венерология. - 2008. - № 3. - С. 61-62.
19. Сухорукова М.В., Гуцин А.В., Малев И.В. Особенности диагностики и лечения *Mycoplasma*-ассоциированных инфекций у мужчин и современные подходы к терапии // Спецвыпуск: Урология. - 2008. - №1. - С. 22–28.
20. Birley H., Duerden B.I., Hart C.A. Sexually transmitted diseases: microbiology and management // J. Med. Microbiol. - 2002. -V.51. - P. 793-807.
21. Гуцин А.Е., Бурцев О.А., Рыжих П.Г. Мониторинг лечения пациентов с инфекцией, вызванной *M. genitalium*, с помощью методов ПЦР и НАСБА в реальном времени // Клиническая дерматология. - 2009. - № 4. - С. 58-63.
22. Shmuel Razin. DNA probes and PCR in diagnosis of *Mycoplasma* infections // Molecular and Cellular Probes. - 1994. - № 8. - P. 497-511.
23. Kong F., James G., Gordon S. Molecular genotyping of human *Ureaplasma* species based on multiple-banded antigen (MBA) gene sequences // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 2000. - V. 5. - P. 1921–1929.
24. Шаповалова О.В. Лабораторные методы диагностики гонореи, трихомоноза и уреаплазмоза // Дерматология и венерология. - 2001. - № 2. - С. 12-15.
25. Прилепская В.Н., Быковская О.В. Уреаплазменная инфекция: клиника, диагностика, лечение // Генитальные инфекции. - 2006. - № 1. - С. 46-52.
26. Мешков В.В. Особенности диагностики и терапии воспалительных урогенитальных заболеваний у женщин, ассоциированных с *Ureaplasma urealyticum* // Анти-биотики и химиотерапия. - 2000. - Т. 45. - № 6. - С. 29-32.