

© А. М. Савичева

ГУ НИИ акушерства и гинекологии
им. Д. О. Отта СЗО РАМН**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
В ДИАГНОСТИКЕ РЕПРОДУКТИВНО ЗНАЧИМЫХ
ИНФЕКЦИЙ: ПРОГРЕСС ЗА 20 ЛЕТ**

УДК: 616.9:618.1/2

■ В статье представлены данные о развитии микробиологических исследований в диагностике репродуктивно значимых инфекций, выполняемых в лаборатории микробиологии в течение последних 20 лет. В широкую практику микробиологической диагностики внедрены как традиционные микробиологические, серологические, иммунофлуоресцентные методы, так и новые передовые технологии, такие как ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) в реальном времени, генотипирование и секвенирование генома микроорганизмов, что позволяет не только выявить возможных возбудителей репродуктивно значимых инфекций, но и установить факторы патогенности микроорганизмов, а также факторы антибиотикорезистентности возбудителей при неудачах терапии.

■ **Ключевые слова:** микробиологические исследования; репродуктивно значимые инфекции; диагностика.

Инфекционная заболеваемость населения нашей страны остается на достаточно высоком уровне. Одним из успешных путей сокращения заболеваемости является качественная и своевременная диагностика не только урогенитальных инфекций, но и всех инфекций, влияющих на репродуктивное здоровье населения. Кроме того, важными направлениями деятельности учреждений акушерско-гинекологического профиля в снижении уровня заболеваемости и смертности является улучшение качества женского здоровья, профилактика нежелательных исходов беременности, профилактика ВИЧ/СПИД и других инфекций репродуктивного тракта.

К репродуктивно значимым инфекциям относят урогенитальные инфекции, наиболее часто это инфекции, передаваемые половым путем, а также трансплацентарные инфекции, имеющие значение исключительно для беременных женщин. Кроме того, любые инфекционные заболевания, перенесенные человеком, особенно в период становления репродуктивной функции, могут влиять и на репродуктивное здоровье.

Своевременная этиологическая диагностика репродуктивно значимых инфекций служит основанием для раннего начала их этиотропной терапии, а также для информации пациентов об особенностях распространения заболевания, последствиях для обоих половых партнеров, а при беременности — о возможном заболевании плода и новорожденного ребенка.

В диагностике инфекций репродуктивного тракта большая роль отводится микробиологическим исследованиям. От правильности поставленного этиологического диагноза во многом зависит успех лечения этих инфекций. Микробиологические методы диагностики способствуют правильному установлению диагноза в том случае, если врач знает заболевание, которое собирается диагностировать, правильно собирает и направляет адекватный материал на исследование, знает состав нормальной микрофлоры урогениталий и знает, как оценить результаты исследований.

За последние 20 лет микробиологическая диагностика репродуктивно значимых инфекций претерпела значительные перемены. На смену традиционным микроскопическим и бактериологическим методам стали приходить методы амплификации нуклеиновых кислот.

Лаборатория микробиологии, созданная еще в 1926 году, в последние 20 лет вышла на передовые позиции в диагностике инфекций репродуктивного тракта, в валидации новых тест-систем, применяемых для диагностических целей, в разработке и внедрении стандартов и алгоритмов диагностики.

Если еще в 1958 году А. П. Егорова впервые в СССР выделила возбудителя листериоза от погибшего новорожденного, то сегодня этот возбудитель можно выявлять как в околоплодных водах, так и в крови плода и новорожденного с применением новых молекулярно-биологических технологий [2]. В начале

70-х годов в институте стали интенсивно изучаться генитальные микоплазмы. Питательные среды, разработанные М. А. Башмаковой, до сих пор являются лучшими для выделения этих микроорганизмов, сравнимыми по чувствительности и специфичности с аналогичными средами зарубежных производителей [1].

В лаборатории более 30 лет ведутся исследования по изучению роли хламидий в патологии женщин и новорожденных детей. В начале 80-х годов А. М. Савичевой впервые в СССР были начаты работы по изучению хламидийной инфекции в акушерстве и гинекологии. Уже в 1983 году описан первый в стране случай выделения хламидий из легких новорожденного ребенка, погибшего при явлениях внутриутробной пневмонии. Доказан антенатальный путь инфицирования плода хламидиями. За многолетний период научных исследований в области урогенитального и неонатального хламидиоза в лаборатории отработаны алгоритмы диагностики этого заболевания с применением современных методов [15].

В последние годы в связи с прогрессом науки и развитием молекулярных и нанотехнологий изменились представления о роли ряда микроорганизмов в развитии патологических процессов в организме женщин и новорожденных детей. В лаборатории микробиологии ГУ НИИАГ им. Д. О. Отта РАМН в течение многих лет проводятся исследования, направленные на выработку стандартов этиологического диагноза ИППП с привлечением всего комплекса диагностических исследований (микроскопических, культуральных, иммунофлюоресцентных, молекулярно-биологических и серологических методов) и создание практически приемлемого алгоритма диагностики и контроля излеченности этих инфекций.

Первым этапом диагностики инфекций репродуктивного тракта должна быть оценка микробиоценоза гениталий с определением количества лейкоцитов, эпителия, соотношения лейкоцитов и эпителия, слизи и морфотипа бактерий. Причем в этой части диагностики активное участие должен принимать клиницист, который берет материал для исследования и интерпретирует его как с точки зрения качества взятия, так и для постановки предварительного (а в ряде случаев окончательного) диагноза. Специально обученный врач на приеме при использовании метода прямой (Bed Side) микроскопии нативных и окрашенных мазков может оценить воспалительную реакцию, обнаружить «ключевые» клетки, мицелий дрожжеподобных грибов, выявить подвижные трихомонады. В лаборатории создан учебный центр по обучению практических врачей микроскопиче-

ским методам оценки микробиоценоза гениталий с целью назначения этиотропной терапии пациентам на первом приеме [6, 16].

Оценка врачом воспалительной реакции на основании физикального осмотра и микроскопического исследования позволяет правильно взять адекватный материал для исследования и направить его в лабораторию для уточнения диагноза [5, 12].

Диагноз бактериального вагиноза устанавливают по критериям Амселя на основании клинической и микроскопической картины. При микроскопическом исследовании обращают внимание на большое количество слущенных клеток многослойного плоского эпителия с адгезированными на них бактериями («ключевые» клетки) и небольшое количество лейкоцитов (соотношение лейкоцитов к клеткам эпителия $< 1 : 1$). Важно помнить, что в ассоциацию микроорганизмов, которые могут быть выделены при бактериальном вагинозе, входят гарднереллы, микоплазмы, включая уреаплазмы, вибрионы рода *Mobiluncus*, анаэробные кокки и анаэробные бактерии [12].

В настоящее время созданы протоколы диагностики бактериального вагиноза, основным методом при этом является микроскопическое исследование нативных или окрашенных метиленовым синим или по Граму препаратов.

Диагностическими критериями бактериального вагиноза являются:

- а) полная или частичная замена лактобацилл смешанной кокковой и/или изогнутой палочковидной флорой и
- б) наличие «ключевых» клеток.

Не рекомендуется использовать культуральную диагностику, МАНК, а также методы определения антигена в диагностике бактериального вагиноза ввиду их низкой чувствительности и специфичности.

Урогенитальный кандидоз имеет характерную клиническую картину, а лабораторная диагностика (преимущественно микроскопическая) заключается в выявлении мицелия и/или почкующихся форм дрожжеподобных грибов.

Для диагностики трихомониаза используются микроскопические и культуральные методы исследования, т. к. подвижные формы трихомонад хорошо видны при исследовании нативных (влажных) препаратов. Сегодня мы имеем значительный процент гипердиагностики инфекции, вызванной *Trichomonas vaginalis*. Поэтому чрезвычайно важно было создать протокол и алгоритм диагностики этой инфекции [15].

- При наличии клинических проявлений рекомендуется провести микроскопическое исследование влажного мазка на трихомонады.

Достаточным основанием для подтверждения диагноза трихомониаза является обнаружение живых простейших, совершающих характерные движения.

- При подозрении на трихомониаз и отрицательных результатах микроскопии должно быть проведено культуральное исследование.
- Культуральный метод обладает более высокой чувствительностью, чем микроскопическое исследование. Культуральное исследование с использованием среды Diamond's или готовых коммерческих систем типа InPouch или Vagicult, также может использоваться как для диагностики, так и для подтверждения диагноза, особенно у мужчин.
- При скрининговых исследованиях или при исследовании большого количества образцов наиболее оптимальным является применение МАНК. В отсутствие международных коммерческих тестов in-house тесты должны быть валидированы с использованием доступных общепринятых международных стандартов.

Для диагностики гонококковой инфекции на сегодняшний день недостаточно проведения микроскопического исследования материалов, полученных из цервикального канала или уретры женщин, с окраской их по Граму, т. к. чувствительность этого метода составляет лишь 30–50 %. У мужчин с клиническими проявлениями уретрита этот метод имеет высокую чувствительность и специфичность. Наши исследования показали, что в настоящее время требуется пересмотр перечня методов, рекомендованных для диагностики гонореи, особенно в плане скрининга этой инфекции. Кроме того, требуется улучшение качества питательных сред, используемых для культуральной диагностики гонореи [7, 8].

Протоколы лабораторной диагностики гонококковой инфекции включают в себя следующие критерии.

- Микроскопический метод с окраской препаратов по Граму может быть использован только при обследовании мужчин с наличием выделений из уретры.
- Культуральный метод является методом выбора при соблюдении условий транспортировки клинического материала, использовании качественных питательных сред, строгого соблюдения условий лабораторного исследования, а также в популяции с повышенным риском заболевания.
- В популяции низкого риска для скрининга и для исследования неинвазивных образцов МАНК подходят больше (к примеру, исследо-

вание мочи у мужчин и вагинальных образцов у женщин).

- При обследовании пациентов без клинических симптомов заболевания МАНК обязательно должны подтверждаться бактериологическим методом.

Для диагностики инфекции, вызванной *Chlamydia trachomatis*, долгое время использовались такие методы, как культуральный, иммунофлюоресцентный (ПИФ) и молекулярно-биологические методы (в частности, ПЦР), направленные на выделение возбудителя, выявление его антигенов или ДНК/РНК [12, 14].

Считалось, что метод культуры клеток (КК) для диагностики хламидийной инфекции является «золотым стандартом» по сравнению с иммунофлюоресцентным методом. На сегодняшний день метод культуры клеток остается по специфичности «золотым стандартом», уступая, однако, по чувствительности молекулярно-биологическим методам. По нашим данным, чувствительность культурального метода равна 40–60 %. Чтобы избежать спорных случаев, при которых метод культуры клеток дает отрицательный результат, а какой-либо другой метод — положительный, многие исследователи предлагают использовать еще один дополнительный метод — арбитражный. Многочисленные исследования как сотрудников лаборатории, так и других отечественных и зарубежных авторов, проводивших сравнение лабораторных методов диагностики урогенитальной хламидийной инфекции, подтвердили важность внедрения методов амплификации нуклеиновых кислот в рутинную диагностику хламидиоза [18]. Поэтому, согласно протоколам диагностики урогенитальной хламидийной инфекции, для рутинной диагностики урогенитальной хламидийной инфекции в Российской Федерации:

- *Рекомендуется использование:*
 - утвержденных и валидированных методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК).
- *Не рекомендуется использование:*
 - культурального метода;
 - методов обнаружения антигенов (ПИФ и ИФА);
 - экспресс-тестов у постели больного;
 - методов определения антител (серологические методы).

В настоящее время разрабатываются новые методы диагностики урогенитальной хламидийной инфекции, такие как ПЦР в реальном времени и NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) в реальном времени.

Для выявления генитальных микоплазм необходимо использовать культуральный метод или метод ПЦР в реальном времени, которые позволяют определить количество микоплазм в исследуемом материале (для *Ureaplasma spp.* и *Mycoplasma hominis*). Следует подчеркнуть, что *Mycoplasma genitalium* выявляется исключительно молекулярно-биологическими методами (ПЦР, ПЦР в реальном времени). Концентрация микоплазм более 10⁴ микробных тел в одном мл или грамме отделяемого может иметь диагностическое значение, особенно при наличии конкретного заболевания, такого как вульвовагинит, цервицит у женщин, уретрит у мужчин, в то время как более низкие концентрации не должны учитываться, поскольку в таких количествах микоплазмы (кроме патогенных видов) могут обнаруживаться у здоровых людей. Недопустимо использование методов прямой иммуофлюоресценции (ПИФ) для выявления генитальных микоплазм, а также серологических методов выявления антител для диагностики заболевания [13].

Изучение вирусных инфекций, начатое еще в середине 20-х годов, продолжается в лаборатории до сих пор. В конце 80-х годов на основании широкомасштабного скрининга была установлена частота инфицирования женщин Санкт-Петербурга вирусом цитомегалии. В эти же годы впервые в стране в лаборатории был разработан и применен метод обнаружения вируса цитомегалии с помощью полимеразной цепной реакции, который в последующем был усовершенствован в связи с появлением новых тест-систем и современного оборудования.

В последнее десятилетие в лаборатории интенсивно изучается папилломавирусная инфекция и ее роль в развитии неопластических процессов шейки матки. В настоящее время дискутируются вопросы включения теста на ВПЧ в первичный скрининг рака шейки матки, т. к. первичный цитологический скрининг недооценивает тяжесть заболевания у 30% женщин. В основе всех рекомендаций по применению теста на вирус папилломы человека в скрининге рака шейки матки лежит тот факт, что цервикальные поражения высокой степени и рак в отсутствие вируса не развиваются. Необходимое условие развития рака шейки матки — длительная персистенция вируса, высокая вирусная нагрузка того или иного потенциально онкогенного типа вируса. Для выявления ВПЧ и определения концентрации вируса используется исключительно ПЦР в реальном времени. В лаборатории с целью прогноза папилломавирусной инфекции разработана система определения физического статуса ВПЧ с опреде-

лением эписомальных и интегрированных генов (Золотоверхая Е. А.) [9, 19].

К возбудителям трансплацентарных инфекций относятся: *Listeria monocytogenes*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, а также вирусы (краснухи, цитомегалии, герпеса ½ типов, герпеса 3 типа — *Varicella zoster*; кори, парвовируса В19 и др.). Следует отметить, что выявление возбудителей той или иной инфекции у беременной не всегда говорит о его передаче плоду. Так, известно, что в 100% плоду передаются листерии, в 50–70% хламидии, в 37% стрептококки группы В, в 30% микоплазмы, в 50% — вирус цитомегалии при первичной инфекции во время беременности. Для диагностики этих инфекций используются описанные выше методы [17].

Для диагностики таких инфекций, как токсоплазмоз, цитомегалия, краснуха, и фазы их течения используют определение разных классов антител в сыворотке крови матери. Для беременной важно выявление острой фазы инфекции, либо инфекции, впервые возникшей во время данной беременности. Поэтому при планировании беременности целесообразно обследование на наличие специфических IgG, свидетельствующих о наличии иммунитета. При постановке беременной на учет в женской консультации, а также при контакте с этими инфекциями, показано исследование сыворотки крови на наличие IgG, IgG-авидность и IgM [4, 17].

Многие исследования, проводимые в лаборатории в последние 20 лет, стали пионерскими. Так, С. Л. Зациорская изучила стрептококки группы В, их эпидемиологию с определением серологических типов, значение для беременных и новорожденных [3]. З. М. Мартикайнен показала роль коринебактерий в формировании физиологического микробиоценоза у родильниц [10, 11]. Е. В. Шипицына изучила факторы антибиотикорезистентности хламидий, возможность установления рецидива и реинфекции путем определения генотипов хламидий [20]. К. В. Шалепо разработала и заложила основы валидации методов диагностики урогенитальной хламидийной инфекции, что позволило значительно улучшить качество производимых в нашей стране тест-систем для методов амплификации нуклеиновых кислот, внедрить их в широкую практику, показав ограничения по чувствительности культурального метода и метода прямой иммуофлюоресценции [18].

За более чем 80-летнюю историю в лаборатории сложилась школа клинических микробиологов, бережно хранящих традиции своих учителей и продолжающих их с использованием самых передовых технологий, а в последние 20 лет ла-

боратория стала передовой в стране по вопросам диагностики репродуктивно значимых инфекций. В настоящее время лаборатория представляет собой мощный научно-практический комплекс, оснащенный современным оборудованием и укомплектованный высококвалифицированными кадрами.

Внедрение методов, основанных на анализе нуклеиновых кислот, в клиническую диагностическую лабораторию значительно повысило ее возможности. Новые высокотехнологичные генетические подходы к идентификации и характеристике микроорганизмов привели к разработке целого ряда практических приложений, позволяющих значительно повысить точность и скорость диагностики инфекций, в том числе инфекций, значимых в акушерстве и гинекологии. Эти приложения включают методы выявления нуклеиновых кислот возбудителя, их количественный анализ, выявление детерминант антибиотикорезистентности и маркеров вирулентности, а также дифференциацию различных генотипов микроорганизмов в пределах одного вида (генотипирование микроорганизмов). С целью генотипирования используют методы мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР), ПЦР с использованием «случайных» праймеров, риботипирование, анализ рестрикционного профиля хромосомной ДНК, электрофорез в пульсирующем электрическом поле, мультилокусное типирование и многие другие подходы. Генотипирование позволяет дифференцировать низко- и высоковирулентные штаммы микроорганизмов, изучать распространение штаммов микроорганизмов в популяции, определять источник инфекции, идентифицировать штаммы, выделенные от пациентов с неудачами терапии.

В результате международного сотрудничества с Уппсальским университетом (Швеция), центром ВОЗ по инфекциям, передаваемым половым путем, создания международной ассоциации по охране репродуктивного здоровья, которой руководит М. Domeika, в лаборатории внедрены европейские стандарты качества микробиологических исследований.

Заключение

Прогресс в области диагностики репродуктивно значимых инфекций привел к тому, что внедрение в широкую практику микробиологической диагностики, кроме традиционных микробиологических, серологических, иммунофлюоресцентных методов, новых передовых технологий, таких как ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) в реальном време-

ни, генотипирование и секвенирование генома микроорганизмов, позволяет не только выявить возможных возбудителей репродуктивно значимых инфекций, но и установить факторы патогенности микроорганизмов, а также факторы антибиотикорезистентности возбудителей при неудачах терапии. Значительный вклад в развитие новых современных методов диагностики внесли сотрудники лаборатории микробиологии. Сложившаяся школа клинической микробиологии в акушерстве и гинекологии, преемственность поколений, энтузиазм и самоотдача сотрудников позволили многие вопросы репродуктивно значимых инфекций поставить впервые и решить на самом высоком уровне. Тесный контакт клиницистов с микробиологами помогает правильно выбрать стратегию в отношении каждого конкретного заболевания. А это большой залог успеха в укреплении здоровья населения и получении здорового потомства.

Литература

1. Баишмакова М. А. Микоплазма-инфекция матери и плода в генезе невынашивания беременности: дис. ...д-ра. мед. наук. — Л., 1972. — 325 с.
2. Баишмакова М. А., Калашишкова Е. П. Врожденный листериоз // Акуш. и гин. — 1985. — №4. — С. 58–61.
3. Зацюрская С. Л., Баишмакова М. А., Калашишкова Е. П. Генерализованная инфекция плода и новорожденного, вызванная стрептококком группы В // Вопросы охраны материнства и детства. — 1987. — №11. — С. 60–62.
4. Инфекции у беременных (диагностика, лечение, профилактика) / Савичева А. М. [и др.] // Ж. акуш. и жен. болезн. — 2002. — Т. LI, вып. 2. — С. 71–77.
5. Инфекции, передаваемые половым путем: руководство для врачей / Соколовский Е. В. [и др.]. — М.: Медпресс-Информ, 2006. — 256 с.
6. Использование метода прямой микроскопии урогенитальных мазков на амбулаторном приеме с целью оптимизации диагностики урогенитальных инфекций / Савичева А. М. [и др.] // Трудный пациент. — 2008. — № 1. — С. 9–12.
7. Качество лабораторной диагностики гонококковой инфекции / Шипицына Е. В. [и др.] // Ж. акуш. и жен. болезн. — 2008. — Т. LVII, вып. 3. — С. 60–66.
8. Лабораторная диагностика инфекции, вызванной *Neisseria gonorrhoeae*: методические рекомендации / Савичева А. М. [и др.]. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. — 80 с.
9. Маркеры папилломавирусной инфекции в скрининге рака шейки матки / Золотоверхая Е. А. [и др.] // Ж. акуш. и жен. болезн. — 2008. — Т. LVII, вып. 4. — С. 31–39.
10. Мартикайнен З. М. Коринебактерии, обнаруженные при кольпитах и вульвовагинальных осложнениях // Клиническая лабораторная диагностика. — 1995. — №4. — С. 45–48.
11. Мартикайнен З. М., Чуранова З. И. Биохимическая дифференциация коринебактерий женского мочеполового трак-

- та // Клиническая лабораторная диагностика. — 1992. — №3-4. — С. 4-6.
12. Методические материалы по диагностике, лечению и профилактике наиболее распространенных инфекций, передаваемых половым путем: методическое пособие / Савичева А. М. [и др.]. — СПб.: Н-Л, 2002. — 112 с.
 13. Роль микоплазм в урогенитальной патологии женщин и их половых партнеров / Савичева А. М. [и др.] // Ж. акуш. и жен. болезн. — 2008. — Т. LVII, вып. 1. — С. 11-22.
 14. Савичева А. М., Башимакова М. А. Урогенитальный хламидиоз у женщин и его последствия. — Н. Новгород: Изд-во НГМА, 1998. — 181 с.
 15. Савичева А. М., Калашиникова Е. П., Полякова Г. П. Внутритрунная пневмония, вызванная хламидиями // Акуш. и гин. — 1983. — № 1. — С. 46-48.
 16. Савичева А. М., Соколовский Е. В., Домейка М. Краткое руководство по микроскопической диагностике инфекций, передаваемых половым путем. — СПб.: Фолиант, 2004. — 128 с.
 17. Савичева А. М., Шипицына Е. В. Перинатальные инфекции: проблемы и пути решения // Акуш. и гин. — 2009. — № 3. — С. 33-38.
 18. Сравнение методов лабораторной диагностики урогенитальных инфекций, вызываемых *Chlamydia trachomatis* / Шалепов К. В. [и др.] // Ж. акуш. и жен. болезн. — 2001. — Т. L, вып. 4. — С. 77-82.
 19. Факторы риска развития рака шейки матки: интеграция ДНК вируса папилломы человека в ДНК клетки / Шипицына Е. В. [и др.] // Патология шейки матки. Генитальные инфекции. — 2005. — № 1. — С. 54-59.
 20. Шипицына Е. В., Савичева А. М. Устойчивость *Chlamydia trachomatis* к антибиотикам // Ж. акуш. и жен. болезн. — 2002. — Т. LI, вып. 1. — С. 77-83.

MICROBIOLOGICAL INVESTIGATIONS IN THE DIAGNOSIS OF REPRODUCTIVELY RELEVANT INFECTIONS: PROGRESS FOR 20 YEARS

Savicheva A. M.

■ **Summary:** The article presents data on progress that has been made for the last 20 years in microbiological diagnostics of reproductively relevant infections at the Laboratory of Microbiology. A number of traditional bacteriological, serological, immunofluorescent methods, as well as advanced molecular techniques such as PCR, real-time PCR, nucleic acid sequence based amplification, genotyping, and sequencing have been implemented in routine diagnostics. This makes it possible not only detect various microorganisms causing reproductively relevant infections, but also to analyze pathogenicity factors and determinants of antimicrobial resistance in cases of treatment failures.

■ **Key words:** microbiological investigations; reproductively relevant infections; diagnosis.

■ Адреса авторов для переписки

Савичева Алевтина Михайловна — д. м. н., заведующая лабораторией микробиологии, профессор.

ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН.

199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.

E-mail: savicheva@mail.ru

Savicheva Alevtina Mikhaylovna — MD, head of the microbiology laboratory, professor.

D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology.

199034 Russia, St. Petersburg, Mendeleyevskaya Line, 3.

E-mail: savicheva@mail.ru