

© А.М. Савичева

НИИ акушерства и гинекологии
им. Д.О. Отта РАМН,
Санкт-Петербург

ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ РЕПРОДУКТИВНО ЗНАЧИМЫХ ИНФЕКЦИЙ

■ Статья посвящена основным вопросам диагностики и лечения репродуктивно значимых инфекций на основании многолетних исследований, проводимых в лаборатории микробиологии НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН. Подчеркивается важность применения микроскопических методов диагностики, выполняемых врачом на амбулаторном приеме с целью ранней диагностики и раннего назначения лечения. Освещены особенности диагностики урогенитальной хламидийной инфекции, папилломавирусной инфекции. Отмечена важность определения типа вируса папилломы человека, вирусной нагрузки и физического статуса вирусной ДНК, что может служить в качестве прогноза неопластической прогрессии. Предложен алгоритм обследования женщин на наличие возбудителей, составляющих TORCH-синдром. Отмечено, что лечение репродуктивно значимых инфекций регламентировано международными стандартами. Показано, что элиминация хламидий при назначении джозамицина («Вильпрафена») и доксициклина («Юнидокса») происходит к 10 дню лечения. Сделан вывод о том, что продолжительность терапии урогенитальной хламидийной инфекции 10 дней для этих антибиотиков оправдана.

■ **Ключевые слова:** диагностика; терапия; репродуктивно значимые инфекции; хламидийная инфекция; папилломавирусная инфекция

В диагностике репродуктивно значимых инфекций большая роль отводится лабораторным, в частности, микробиологическим исследованиям. От точности поставленного этиологического диагноза на 95 % зависит успех лечения этих инфекций. Правильное установление диагноза зависит от того, насколько адекватен материал, направленный на исследование, насколько правильно выбраны методы диагностики, а также как врач интерпретирует полученные материалы.

Микробиологическая диагностика генитальных и перинатальных инфекций до недавнего времени была ориентирована на выделение возбудителя и его стандартную идентификацию по биологическим свойствам и антигенному строению. Введение в широкую практику методов определения нуклеиновых кислот с применением соответствующих праймеров, казалось бы, может решить проблему быстрой и точной диагностики бактериальных и вирусных инфекций. Опыт диагностической работы показал, что оценка инфекционных поражений не может быть основана только на определении нуклеиновых кислот, в особенности при латентных инфекциях. В силу своей сверхчувствительности, благодаря которой возможно определение минимальных количеств генетического материала возбудителя, присутствующего в организме больного при латентной инфекции, необходим осторожный подход к результатам молекулярно-биологического тестирования и их сравнение с результатами других методов диагностики.

Прогресс в области диагностики урогенитальных инфекций привел к тому, что практически врачу трудно сегодня оценить результаты исследования, особенно при использовании таких сверхчувствительных методов, как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Этим можно объяснить гипердиагностику урогенитальных инфекций. Не все обнаруженные микроорганизмы являются этиологическим фактором развития инфекционного заболевания репродуктивных органов. Назрела необходимость оптимизации и стандартизации методов микробиологической диагностики генитальных инфекций.

В лаборатории микробиологии НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН в течение последних лет проводятся исследования, направленные на выработку стандартов этиологического диагноза генитальных и перинатальных инфекций, с привлечением всего комплекса диагностических исследований (микроскопических, культуральных, иммунофлюоресцентных, молекулярно-биологических и серологических методов) и создание практически приемлемого алгоритма диагностики, терапии и контроля излеченности репродуктивно значимых инфекций.

Значение микроскопических методов диагностики

Обязательным этапом диагностики урогенитальных инфекций у женщин должна быть оценка микробиоценоза гениталий микроскопическим методом. При микроскопии определяют количество лейкоцитов, эпителия, слизи и морфотип бактерий.

Нарушение микробиоценоза влагалища — дисбиоз — имеет клиническое проявление, наиболее яркое при бактериальном вагинозе (БВ). Диагноз БВ устанавливают по определенным критериям Amsol на основании клинической и микроскопической картины. Важно помнить, что в ассоциации микроорганизмов, которые могут быть выделены при БВ, входят гарднереллы, микоплазмы, уреаплазмы, вибрионы рода *Mobiluncus*, анаэробные кокки и анаэробные бактерии.

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

Трихомониаз также не требует специальных, особенно молекулярно-биологических методов исследования, так как подвижные формы трихомонад хорошо видны при исследовании нативных препаратов или при их культивировании.

Таким образом, целый ряд урогенитальных заболеваний можно диагностировать микроскопическими методами. Обучение методам прямой «Bed Side» микроскопии мазков из влагалища, уретры, цервикального канала практического врача акушера-гинеколога, ведущего амбулаторный прием, предполагает раннюю диагностику таких состояний, как бактериальный вагиноз, кандидоз, трихомониаз, а также выявление воспалительной реакции, и, в результате, раннее назначение специфического лечения [3].

Оценка врачом воспалительной реакции на основании физикального и микроскопического исследований позволит правильно взять адекватный материал для исследования и направить его в лабораторию для уточнения диагноза.

Прежде, чем направить клинический материал для исследования, врач должен сформулировать инфекционный диагноз (бактериальный вагиноз, вульвовагинит, цервицит, сальпингоофорит и т. д.). Далее он должен правильно взять адекватный материал, правильно выбрать метод исследования и правильно транспортировать материал в лабораторию. Получив заключение из лаборатории, врач должен правильно интерпретировать полученный результат, с тем, чтобы назначить терапию.

Врач-клиницист должен знать состав нормальной микрофлоры урогениталий, чтобы оценить результаты исследований. Из огромного количества разнообразных микроорганизмов очень редкие действительно вызывают заболевание. К патогенным микроорганизмам, выделение которых требует назначения антибактериальных препаратов, относят *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus dukrei*, *Chlamydia trachomatis*, а также *Trichomonas vaginalis*. Су-

ществует большая группа условно патогенных микроорганизмов, которые могут вызывать заболевание при определенных условиях — это микоплазмы, уреаплазмы, энтерококки, энтеробактерии, стафилококки, стрептококки, гарднереллы, дрожжеподобные грибы.

Особенности диагностики урогенитальной хламидийной инфекции

Многообразие методов лабораторной диагностики урогенитальных инфекций, многообразие клинических материалов, используемых для исследования, ставят перед лабораториями задачу валидации (оптимизации) этих методов. Особенно это касается *Chlamydia trachomatis*, так как применяемые методы диагностики урогенитальной хламидийной инфекции дают разные результаты чувствительности и специфичности.

В разных научных центрах мира предпринимались попытки по созданию критериев сравнения разных методик. Наиболее значимые критерии при диагностике — это чувствительность и специфичность; такими же важными критериями являются прогностическая значимость положительного и отрицательного результата. При этом следует различать аналитическую и диагностическую чувствительность. Аналитическая чувствительность представляет собой то минимальное количество антигена или копий ДНК в одном миллилитре раствора образца, которое может быть определено данной тест-системой. Диагностическая чувствительность оценивается в процентах и определяет количество пациентов с данным заболеванием, дающих истинно положительные результаты при использовании конкретного метода. Диагностическая специфичность тест-систем определяется процентом здоровых людей, имеющих истинно отрицательные результаты анализа.

Долгое время считалось, что метод культуры клеток (КК) для диагностики хламидий является «золотым стандартом» по сравнению с микроскопическими методами, но с развитием методов молекулярной диагностики стали возникать сомнения в роли микроскопических методов и метода КК. На данном этапе метод КК остается по специфичности «золотым стандартом», уступая, однако, по чувствительности. Чтобы избежать спорных случаев, при которых метод КК показывает отрицательный результат, а другой метод — положительный, многими авторами предлагается использовать еще один дополнительный метод — арбитражный. Результат считается положительным при положительном результате метода КК или при положительном результате двух других методов [6].

В 1991 году G.L. Ridgway и D. Taylor-Robinson

опубликовали статью, посвященную основному вопросу диагностики хламидий: какой лабораторный тест предпочтителен? На основе литературных данных, известных на тот момент, они сопоставили чувствительность и специфичность методов КК, прямой иммунофлюоресценции, иммуноферментного анализа и серологического анализа. Чувствительность метода КК при работе с пробами из цервикального канала была оценена между 75 % и 80 % при сравнении его с прямой иммунофлюоресценцией и иммуноферментным анализом [17].

Большинство исследователей пришли к заключению, что при специфичности культурального метода в 100 %, чувствительность его остается очень низкой. Для повышения качества диагностики урогенитальной хламидийной инфекции необходимо применение других альтернативных методов, таких как ПИФ (прямая иммунофлюоресценция) и ПЦР. При этом необходимо в каждой лаборатории проводить валидацию новых методов диагностики и определение параметров чувствительности, специфичности и прогностической значимости каждого метода. Кроме того, эти параметры определяются при применении разных клинических материалов, используемых для исследования.

В настоящее время проводят сравнение различных материалов для обнаружения *Chlamydia trachomatis*, пытаясь найти менее травматичный способ взятия клинических образцов. Такими материалами являются первая порция свободно выпущенной мочи и отделяемое влагалища.

Таким образом, сравнение методов и клинических материалов показало неоднозначность применяемых тестов в клинической практике. Поиск наиболее чувствительных и специфичных тестов, создание алгоритма исследования легли в основу первого этапа предпринятого исследования.

В первую очередь проводилась стандартизация методов диагностики урогенитального хламидиоза. Проведено комплексное обследование 797 женщин и 453 мужчин. Проведено исследование материалов из цервикального канала, уретры и влагалища у женщин и материалов из уретры и первой порции мочи у мужчин. Применялись следующие методы диагностики: ПИФ с двумя коммерческими наборами, культуральный, ПЦР с праймерами к рибосомальному (R1 и R2) гену и к криптической плазмиде. В качестве контроля ПЦР служили коммерческие наборы фирмы "Abbott-Digene" и праймеры Pd1/Pd2 (Швеция).

Проведена оценка чувствительности, специфичности и прогностической значимости положительного и отрицательного результата каждого метода. Культуральный метод, который до недавнего времени считался «золотым стандартом» в

диагностике хламидийной инфекции, с появлением методов анализа нуклеиновых кислот приобрел другое значение. Понятие «золотого стандарта» стало более комплексным. На сегодняшний день «золотым стандартом» диагностики урогенитальной хламидийной инфекции является сочетание культурального метода и метода ПЦР, а внедрение в клиническую практику метода NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) в реальном времени позволит заменить эти все методы и сделать его «золотым стандартом» [5].

Проведено сравнение использования разных клинических материалов для диагностики урогенитального хламидиоза. Наряду с традиционно используемыми клиническими материалами для исследования на хламидии (соскоб из цервикального канала, уретры у женщин и уретры у мужчин) проведено исследование первой порции свободно выпущенной мочи у мужчин и отделяемого влагалища у женщин. При исследовании первой порции мочи у мужчин чувствительность и специфичность методов ПЦР были высокими (около 100 %), что позволило рекомендовать использование этого клинического материала для выявления хламидий. Использование отделяемого влагалища в качестве материала для диагностики хламидийной инфекции ограничено, так как при высокой специфичности метода ПЦР при исследовании этих проб чувствительность его была низкой (в пределах 53–73 %). Но при проведении скрининговых эпидемиологических исследований эти материалы также могут быть использованы.

Разработана методика пулирования соскобов эпителия цервикального канала для выявления *C. trachomatis* методом ПЦР. Исследовано 1500 образцов с формированием пулов по 5 и 10 образцов. При сравнении результатов пулирования с результатами индивидуального тестирования показано, что пулирование не повлияло на чувствительность и специфичность анализа. Показатель распространенности хламидийной инфекции 6,6 %, определенный при индивидуальном тестировании, оказался в пределах 95 % доверительных интервалов (95 % CI), рассчитанных с использованием данных пулирования по 5 проб (95 % CI: 4,5–7,7 %) и по 10 (95 % CI: 4,3–7,7 %). Было показано, что при эпидемиологическом исследовании пулирование проб по 5 сокращает расход средств на 80 %, по 10 — на 90 % (табл. 1). Таким образом, пулирование цервикальных проб представляется надежным и экономичным диагностическим подходом к реализации скрининговых и эпидемиологических программ.

На сегодняшний день можно утверждать, что основа в диагностике урогенитальной инфекции — это выявление ДНК/РНК хламидий моле-

Таблица 1

Результаты пулирования цервикальных соскобов для выявления *C.trachomatis* методом ПЦР

	Пулирование проб		Индивидуальное определение <i>C. trachomatis</i>
	по 5	по 10	
Количество проб	1500	1500	1500
Количество пулов	300	150	—
Количество положительных пулов	80	69	—
Чувствительность	100 %	100 %	—
Специфичность	100 %	100 %	—
Распространенность хламидийной инфекции (95 % CI)	6,1 (4,5–7,7)	6,0 (4,3–7,7)	6,6 %
Экономия средств для выявления индивидуальных случаев хламидийной инфекции	53,3 %	44,0 %	—
Экономия средств для оценки распространенности хламидий	80 %	90 %	—
Определение распространенности <i>C.trachomatis</i> с использованием методики пулирования: (1) $p = \{1 - [1 - (s/n)]^{1/c}\} \times 100 \%$ (2) $SD = \{[s/n][1 - (s/n)(2/c) - 1] / c2n\}^{0,5} \times 100 \%$ (3) $95 \% CI = p \pm 2 \sqrt{SD}$, где p — распространенность хламидий SD — стандартное отклонение $95 \% CI$ — 95 % доверительный интервал s — количество положительных пулов n — общее количество пулов c — количество проб в пуле			

кулярно-биологическими методами или выделение хламидий в культуре клеток. В связи с тем, что чувствительность культурального метода при его 100 % специфичности не превышает 60 %, будущее принадлежит методам ПЦР, особенно ПЦР в реальном времени и NASBA в реальном времени.

Серологические методы являются вспомогательными в диагностике урогенитального хламидиоза. При восходящей инфекции необходимо установить сероконверсию антител (IgG или IgA). Предстоит еще оценить диагностическое значение антител класса G к белкам теплового шока (Hsp60) *Chlamydia trachomatis*. Наши предварительные данные по определению IgG к Hsp60 хламидий показали, что частота выявления этих антител у беременных женщин с наличием IgG к МOMP хламидий составила 31 %, у женщин с наличием воспалительных заболеваний органов малого таза (ВЗОМТ) — 60 %, у женщин с внематочной беременностью — 90 %.

Папилломавирусная инфекция цервикального канала шейки матки

В течение последних двух десятилетий данные эпидемиологических и молекулярно-биологических исследований позволили получить убедительные доказательства этиологической роли некоторых типов вируса папилломы человека (ВПЧ) в развитии рака шейки матки (РШМ). Причинная связь ВПЧ с РШМ была оценена с использованием всех применяемых в настоящее время критериев и принята научным сообществом; на сегодняшний день не существует убедительных альтернативных гипотез относительно этиологии РШМ.

Признание факта, что папилломавирусная инфекция (ПВИ) — необходимое условие развития РШМ, имеет огромное практическое значение. В первую очередь речь идет о пересмотре концепции групп риска: к группе высокой степени риска развития РШМ сейчас принято относить женщин с персистирующей ПВИ. Следствием этого является разработка новых стратегий скрининга и профилактики. Изменения вносятся и в определение факторов риска развития РШМ. Если раньше к ним относились такие факторы, как низкий социально-экономический статус, большое количество половых партнеров, курение, использование оральных контрацептивов, перенесенные инфекции генитального тракта, то сейчас большинство из этих факторов рассматриваются только как факторы риска инфицирования ВПЧ. Очевидно, что внимание должно быть сосредоточено на факторах, имеющих прямое или опосредованное отношение к персистенции вируса и реализации его онкогенного потенциала.

Онкогенный потенциал папилломавирусов существенно варьирует; по способности инициировать диспластические (предраковые) изменения и рак папилломавирусы условно разделены на группы «высокого» (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) и «низкого» (6, 11, 40, 42, 43, 44) риска возникновения опухолевой трансформации инфицированного эпителия. Самым распространенным типом ВПЧ высокого онкогенного риска является 16 тип — его обнаруживают более чем в

50 % случаев РШМ; неудивительно, что большая часть работ посвящена изучению ВПЧ 16 типа, и именно этот тип вируса служит моделью для изучения вирусного канцерогенеза.

Молекулярные основы типоспецифических различий в трансформирующей активности ВПЧ изучены пока недостаточно. Считается, что за онкогенность ВПЧ «группы высокого риска» отвечают ранние белки ВПЧ Е6 и Е7, которые в процессах immortalization и трансформации клеток действуют согласованно.

ДНК ВПЧ может находиться в опухолевых клетках в двух формах — эписомной и интегрированной. Биологическое значение интеграции вирусной ДНК в геном хозяина до сих пор остается неясным. Интеграция ДНК ВПЧ в клеточный геном не является необходимым этапом в жизненном цикле вируса; в результате этого события вирус теряет часть своего генома, и продукция инфекционного потомства прекращается. Однако интеграция, возможно, является важным событием в цервикальном канцерогенезе, так как она очень часто ассоциирована с неопластической прогрессией. В результате интеграции повышается стабильность транскриптов генов Е6 и Е7 ВПЧ, и нарушается интактность гена Е2, регулирующего их транскрипцию [4].

Данные о формах персистенции вирусного генома на разных стадиях опухолевой прогрессии противоречивы. Как правило, на ранних стадиях опухолевого процесса вирусная ДНК выявляется в эписомной форме, тогда как на поздних стадиях — в интегрированной. Однако описаны случаи, когда в карциномах выявляли ДНК ВПЧ либо в эписомной, либо в комбинации эписомной и интегрированной форм [8].

Недавно был предложен методический подход с применением ПЦР в реальном времени, основывающийся на следующих допущениях: 1) так как ген Е2 чаще всего разрушается при интеграции ВПЧ, при интегрированной форме ДНК мишень Е2 не обнаруживается; 2) при эписомной форме вируса обе мишени присутствуют в одинаковом количестве; 3) если с геномом клетки-хозяина интегрирована только часть вируса, количество копий Е2 будет меньше, чем Е6.

В работе Reitsaro и соавт. [16] с помощью данного метода был определен физический статус ДНК ВПЧ в 31 случае цервикальных повреждений (НЦИН-ЦИН III) от 24 женщин, наблюдавшихся в течение 10 лет. Данный метод рассматривается авторами как очень чувствительный инструмент оценки физического статуса ВПЧ, который может быть полезным для предсказания прогрессии заболевания.

Пониманию механизмов канцерогенеза, индуцированного ВПЧ, должны способствовать также

полная характеристика генома ВПЧ и изучение функций вирусных генов различных типов и молекулярных вариантов ВПЧ. Несмотря на то, что биологическая и клиническая значимость таких факторов, как интеграция вируса и вирусная нагрузка, инфекция различными типами и молекулярными вариантами ВПЧ, в настоящее время активно изучаются и обсуждаются, имеющиеся данные не позволяют однозначно оценить их прогностическую значимость из-за ряда методологических ограничений. Тщательно спланированные молекулярные и эпидемиологические исследования наряду с функциональным анализом помогут оценить роль этих факторов в неопластической прогрессии и приведут к маркерам высокой диагностической и прогностической ценности.

В период 2000–2005 годов нами проведены исследования по оценке метода определения физического статуса вируса папилломы человека как потенциального инструмента прогноза неопластической прогрессии. Эта работа проводилась в несколько этапов.

На первом этапе необходимо было получить стандарт для определения количества ДНК ВПЧ 16 типа в реальном времени.

ВПЧ 16 типа, клонированный в плазмиду pBR322, был любезно предоставлен доктором E.M. de Villiers (Центр изучения рака, Университет Гейдельберга, Германия). Приготовление компетентных клеток *Escherichia coli* штамм JM107 и трансформацию их плазмидой pBR322, содержащей геном ВПЧ 16 типа, проводили в соответствии с методикой, описанной Inoue H. [12]. Готовые компетентные клетки разливали по 100 мкл в охлажденные пробирки и замораживали при -70°C .

Аликвоту предварительно оттаянных на льду компетентных клеток делили на две части по 50 мкл. В одну часть добавляли 4 мкл 0,5 М β -меркаптоэтанол и 2 мкл (10 пг) плазмидной ДНК, после чего смесь инкубировали при 0°C в течение 30 минут. Вторую часть использовали для контрольной трансформации — без добавления плазмиды. Клетки подвергали тепловому шоку, инкубируя их 30 секунд при 42°C с последующим охлаждением на льду в течение 5 минут. К трансформационной смеси добавляли 400 мкл SOC-среды и инкубировали 30 минут на бактериальном шейкере (200–300 об./мин.) при 37°C . Трансформанты высевали на заранее приготовленные чашки Петри с твердой LB-средой, содержащей ампициллин (25 мкг/мл), инкубировали при 37°C в течение 18 часов.

Для выделения плазмидной ДНК использовали методику, предложенную Lee S.Y. и соавт. [13]. Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре Smart Spec 3000 (Bio-Rad, США).

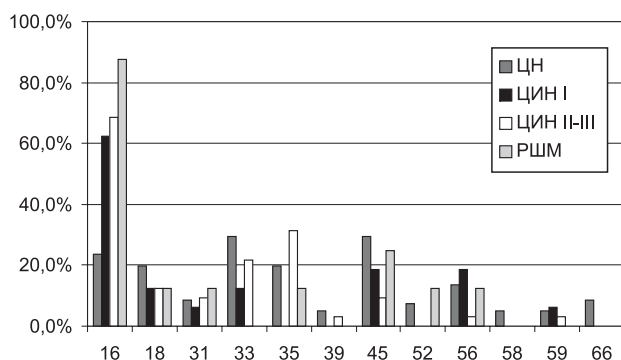


Рис. 1. Частота встречаемости ВПЧ типов высокого онкогенного риска у женщин с патологией шейки матки

Полученный таким образом стандарт используется для определения вирусной нагрузки и физического статуса ВПЧ 16. Стандартные кривые строятся амплификацией серии последовательных разбавлений стандарта от 5×10^7 до 5×10^2 . Результаты пересчитываются на 50 нг клеточной ДНК. Для оценки формы ДНК вируса используется отношение числа копий гена E2 к числу копий гена E6 ($E2/E6$). Форма ДНК определяется как интегрированная, если ген E2 не обнаруживается ($E2/E6 = 0$), эписомная — если количество копий гена E2 равняется количеству копий гена E6 ($E2/E6 = 1$). В случае, если число копий гена E2 меньше числа копий гена E6, форма ДНК определяется как смешанная.

На втором этапе определили частоту встречаемости ВПЧ 16 типа у женщин с разной степенью дисплазии шейки матки и оценили ассоциацию степени дисплазии с вирусной нагрузкой и физическим статусом вирусной ДНК (рис. 1).

Проанализирован материал, полученный от 150 пациенток, и показано, что частота встречаемости ВПЧ 16 типа увеличивается со степенью неопластических изменений эпителия шейки матки. Для ВПЧ 16 типа выявлена ассоциация степени дисплазии с вирусной нагрузкой и статусом ДНК вируса. Определение типа ВПЧ, вирусной нагрузки и статуса вирусной ДНК может служить инструментом прогноза неопластической прогрессии.

ДНК ВПЧ типов высокого онкогенного риска была обнаружена в 83 пробах, полученных от женщин с патологией шейки матки. В 50 пробах (60,2 %) был выявлен ВПЧ 16 типа, при этом частота встречаемости 16 типа была ассоциирована со стадией заболевания ($p < 0,001$). В половине всех случаев выявления ВПЧ 16 типа (25 из 50) была обнаружена ДНК других онкогенных типов ВПЧ.

Физический статус ВПЧ 16 типа был проанализирован отдельно для случаев инфицирования только 16 типом ВПЧ ($n = 28$) и случаев инфицирования несколькими типами ВПЧ ($n = 30$). Ре-

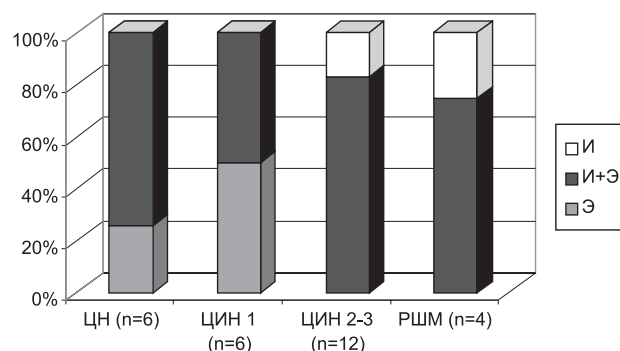


Рис. 2. Статус ДНК ВПЧ 16 типа в случаях моноинфекции

зультаты определения статуса ДНК ВПЧ 16 типа в случаях моноинфекции представлены на рисунке 2. В двух из 6 случаев цитологической нормы была выявлена эписомная форма ДНК, в 4 — смешанная. В 3 из 6 проб, полученных от женщин с легкой дисплазией, была обнаружена эписомная форма ДНК ВПЧ, в трех — смешанная. При высокой степени дисплазии и плоскоклеточной карциноме эписомная форма вируса не встречалась. У 10 из 12 женщин с высокой степенью дисплазии (II–III) ВПЧ 16 типа был выявлен в смешанной форме, у двух — в интегрированной. Одна из 4 проб, полученных от женщин с РШМ, содержала интегрированную форму ДНК ВПЧ 16 типа, три — смешанную.

Результаты определения статуса ДНК ВПЧ 16 типа в случаях инфицирования несколькими типами ВПЧ представлены на рисунке 3. У женщин без атипии эписомную форму ДНК вируса типа выявили в 3 случаях из 13, смешанную — в 10. В случаях легкой дисплазии эписомная форма ДНК была обнаружена в одной пробе из 4, смешанная — в 3. При умеренной и тяжелой дисплазии эписомная форма ВПЧ была обнаружена в двух случаях из 10, смешанная — в 8. У женщин с РШМ эписомная форма вируса была выявлена в двух случаях из 3, смешанная — в одном. Ни в одном случае множественной инфекции полностью интегрированная форма ВПЧ 16 типа не встречалась.

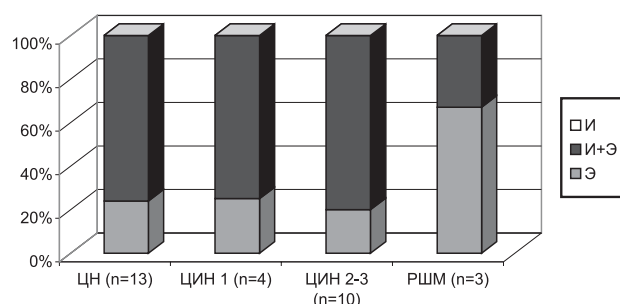


Рис. 3. Статус ДНК ВПЧ 16 типа в случаях множественной инфекции

Таблица 2

Оценка результатов серологического исследования с TORCH-антигенами

IgG	IgM	Интерпретация результатов
—	+	Ранняя фаза острой инфекции
+	+	Острая инфекция или обострение хронической
+	—	Состояние иммунитета
—	—	Группа риска Нет инфекции Нет иммунитета Опасность возникновения инфекции

Применение критерия Крускала–Уоллиса для случаев инфицирования только 16 типом ВПЧ позволило выявить ассоциацию между степенью дисплазии и степенью интеграции, определяемой отношением E2/E6 ($p < 0,25$).

Трансплацентарные инфекции

К возбудителям трансплацентарных инфекций относятся: *Listeria monocytogenes*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, а также вирусы (краснухи, цитомегалии, герпеса 1 и 2 типов, герпеса 3 типа — *Varicella zoster*, кори, парвовирус В19 и др.). Следует отметить, что выявление возбудителей той или иной инфекции у беременной не всегда говорит о его передаче плоду [1, 9, 11, 15]. 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 трансплацентарных инфекций отбор наиболее подходящего лабораторного метода происходит в зависимости от знания патогенеза той или иной инфекции. Если имеется в виду возможный трансплацентарный путь передачи возбудителя от женщины ее плоду, то по большей части используют определение антител разных классов в сыворотке крови матери. Фактически при этом выясняется, была ли у женщины та или иная инфекция и как давно она была.

В таблице 2 представлена оценка серологических показателей при использовании антигенов TORCH-инфекций. TORCH: Т — токсоплазмоз, R — rubella (краснуха), С — цитомегалия, Н — герпес.

Интерпретация результатов серологических реакций: наличие в крови специфических IgM-антител в отсутствие IgG-антител свидетельствует о ранней острой фазе заболевания и о необходимости начала лечения (токсоплазмоз, например) или прерывания беременности (при краснухе). Наличие специфических антител обоих классов говорит об острой инфекции в более поздней фазе. В этих случаях решение зависит от вида возбудителя, срока беременности и других обстоятельств, характеризующих ситуацию. Наличие у беременной лишь IgG-антител говорит о состоянии иммунитета. Отсутствие антител обоих классов свидетельствует о том, что инфекции в прошлом не было, то есть имеется возможность первичного инфицирования во время беременности и возникновения внутриутробной инфекции плода со всеми ее особенностями и последствиями. Для таких беременных показаны повторные серологические исследования, чтобы проследить возникшую первичную инфекцию, особенно опасную для плода.

При определении М-антител у беременных довольно часто по разным причинам наблюдаются ложноположительные реакции [14]. В таких случаях динамика титров IgG-антител в сыворотках крови, взятых с интервалом 10–14 дней, в частности, нарастание в 4 и более раз, служит подтверждением заболевания у матери. Особенно важно при наличии IgG-антител определение индекса авидности. Об инфекции, впервые возникшей во время беременности, свидетельствует определение низкоавидных IgG (ниже 30 %). Данные по индексам авидности приведены в таблице 3. Важным для беременных является выяв-

Таблица 3

Индекс авидности IgG при разных инфекциях у матери

Инфекция	Острая первичная инфекция	Инфекция в прошлом	Стадия реконвалесценции
Цитомегалия	35 % и ниже	42 % и выше	36–41 % поздняя стадия инфекции Повторное обследование через 7–10 дней
Краснуха	30 % и ниже	40 % и выше	31–39 % поздняя стадия инфекции Повторное обследование через 7–10 дней
Токсоплазмоз	30 % и ниже	40 % и выше	31–39 % поздняя стадия инфекции Повторное обследование через 7–10 дней
Герпес	35 % и ниже	41 % и выше	36–40 % поздняя стадия инфекции Повторное обследование через 7–10 дней

Таблица 4

Контакт с больным, имеющим сыпь (результат исследования сыворотки крови на Rubella IgG и IgM)

IgG+ IgM–	IgG+ IgM+	IgG– IgM–	IgG– IgM+
Краснуха в прошлом	Возможна первичная инфекция Получить парную сыворотку 1. Недавняя первичная краснуха (при сероконверсии IgG) 2. Реинфекция 3. Неспецифическая IgM– реакция (обследовать на парвовирус В19 и на инфекционный мононуклеоз — EBV)	Повторно получить сыворотку (через 10 дней и через 4 недели) Сероконверсия, появление IgM (свежая первичная краснуха)	Повторно получить сыворотку 1. Сероконверсия (появление IgG, нарастание IgM) 2. Без нарастания IgM: неспецифическая реакция

ление иммунного ответа и по возможной интерпретации результатов исследований при контакте беременной с больным, имеющим сыпь. Эти сведения приведены в таблице 4.

Нами был составлен алгоритм обследования женщин, планирующих беременность, и алгоритм обследования женщин, встающих на учет по беременности. При планировании беременности необходимо обследование на наличие в сыворотке крови только IgG к возбудителям, составляющим TORCH-синдром. При постановке на учет по беременности необходимо провести серологическое обследование женщин на наличие IgG, IgG-авидность и IgM в случае, если женщина не обследована при планировании беременности, при отсутствии IgG и при клинических ситуациях, например, при контакте беременной с больным с сыпью, при карантине по краснухе и др.

Особенности терапии репродуктивно значимых инфекций

Основа терапии репродуктивных инфекций — назначение специфических антибактериальных или противовирусных препаратов. Существуют международные и европейские методические рекомендации, регламентирующие назначение тех или иных терапевтических средств [1, 7, 10, 18].

Нами проведен цикл работ, посвященных назначению тех или иных антибиотиков. На первом этапе исследований антибактериальной активности нами была отработана методика проведения теста изучения антибиотикочувствительности хламидий. При этом было показано отсутствие какой-либо корреляции между чувствительностью хламидий к антибиотикам *in vitro* и успехом или неудачей терапии урогенитальной хламидийной инфекции.

В дальнейшем мы провели мониторинг терапии урогенитального хламидиоза с применением двух антибиотиков (доксидиклин — «Юнидокс Соллютаб®» и джозамицин — «Вильпрафен®») с тем, чтобы показать, насколько быстро исчезают хламидии на фоне терапии.

Материалами для исследования служили маз-

ки — соскобы из цервикального канала у женщин и уретры у мужчин.

«Вильпрафен®» назначался внутрь по 500 мг 2 раза в день в течение 10 дней, «Юнидокс Соллютаб®» — по 100 мг 2 раза в день 10 дней. Препараты были любезно предоставлены фирмой «Астелас Фарма».

Для оценки эффективности элиминации хламидий в ходе терапии пациенткам было предложено лечение одним из этих препаратов и проведение контрольных исследований во время терапии (на 2, 5, 7 и 10 дни после начала лечения) и после лечения (через 1, 2, 3 недели и 1, 3 и 6 месяцев). Контрольные исследования проводили тремя методами одновременно: культуральным, методом ПЦР и методом NASBA в реальном времени.

Уже в первые дни приема вильпрафена или юнидокса пациентки, обратившиеся к врачу с жалобами, отметили существенное улучшение самочувствия, а к концу лечения врачи констатировали улучшение клинической картины в большинстве случаев.

Результаты микробиологических исследований оказались следующими: на 2 день приема препарата хламидии были обнаружены культуральным методом только у 37 % пациентов, в то время как все пробы были положительными при исследовании методом ПЦР. Во все остальные сроки исследований, проводимых на фоне терапии, хламидии в КК не выделялись. Уже на 7 день терапии количество пациентов, у которых хламидии выявлялись методом ПЦР, сократилось вдвое, на 10 день — втрое, а через 3 недели после окончания лечения ПЦР давала отрицательные результаты у всех пациентов. Метод NASBA в реальном времени, позволяющий определить только жизнеспособного возбудителя по наличию mРНК, показал следующие результаты: на 2 день терапии вильпрафеном хламидии сохранялись у 82 % женщин, на 5 день — у 45 %, на 7 день — у 20 %, на 10 день — у 7 %. При лечении юнидоксом — динамика элиминации хламидии была такой же как и при лечении вильпрафеном. Однако при лечении юнидоксом на 10 день терапии хламидии уже не

выявлялись при использовании метода NASBA. Таким образом, данные мониторинга свидетельствуют о быстрой элиминации возбудителя в ходе лечения. Курс терапии вильпрафеном и юнидоксом продолжительностью в 10 дней является оправданным.

Сочетание ПЦР и культурального метода представляется нам эффективным при проведении контроля излеченности урогенитальной хламидийной инфекции. Так как нежизнеспособные хламидии могут обнаруживаться в клетках эпителия цервикального канала и уретры еще некоторое время после завершения лечения (в нашем исследовании хламидии были выявлены через 1 неделю после окончания терапии у трех пациентов), то проведение контроля излеченности можно рекомендовать не ранее, чем через 2–3 недели после окончания лечения. Применение метода NASBA в реальном времени представляется перспективным как для диагностики, так и для контроля излеченности, так как позволяет определить жизнеспособность возбудителя.

Заключение

В результате проведенных исследований по оптимизации методов микробиологической диагностики урогенитальных инфекций, в частности, урогенитального хламидиоза, составлен алгоритм исследования, включающий использование одновременно двух методов (культурального в сочетании с ПЦР). Внедрение в практику такого метода как NASBA в реальном времени позволит пересмотреть понятие «золотого стандарта».

Определение типа ВПЧ в цервикальном канале, вирусной нагрузки и статуса вирусной ДНК может служить инструментом прогноза неопластической прогрессии.

Создание алгоритма обследования беременных и планирующих беременность женщин для диагностики острой впервые возникшей инфекции и латентной хронической (анамнестической) инфекции позволит правильно прогнозировать течение и исход беременности.

Лечение репродуктивно значимых инфекций регламентировано международными и европейскими стандартами. Требуется разработка федеральных стандартов по проведению диагностики и терапии инфекционных заболеваний урогенитального тракта беременных и небеременных женщин.

Литература

1. Башмакова М.А. Парвовирусная инфекция В19 при беременности. I Свойства вируса, клиническая картина заболевания, патогенез, диагностика / Башмакова М.А., Савичева А.М. // Пренатальная диагностика. — 2005. — Т. 4, № 2. — С. 94–96.
2. Методические материалы по диагностике, лечению и профилактике наиболее распространенных инфекций, передаваемых половым путем / Савичева А.М., Соколовский Е. В., Домейка М. [и др.]. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2002. — 112 с.
3. Савичева А.М. Краткое руководство по микроскопической диагностике инфекций, передаваемых половым путем / Савичева А.М., Соколовский Е.В., Домейка М. — СПб.: Фолиант, 2004. — 128 с.
4. Шипицына Е.В. Папилломавирусная инфекция: факторы риска цервикальной неопластической прогрессии / Шипицына Е.В., Бабкина К.А., Оржесковская Е.А., Савичева А. М. // Ж. акуш. и жен. болезн. — 2004. — Т. LIII, Вып. 3. — С. 38–45.
5. Шипицына Е.В. Метод амплификации нуклеиновых кислот NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) и возможности его применения в акушерско-гинекологической практике / Шипицына Е.В., Будилковская О.В., Савичева А. М. // Ж. акуш. и жен. болезн. — 2005. — Т. LIV, Вып. 2. — С. 83–89.
6. Black C.M. Current methods of laboratory diagnosis Chlamydia trachomatis infections / Black C.M. // Clin. Microbiol. Rev. — 1997. — Vol. 10. — P. 160–184.
7. European STD Guidelines // International J. of STD Aids. — 2001. — Vol. 12, Suppl. 3. — P. 102.
8. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high-grade cervical intraepithelial / Xi L.F., Koutsky L. A., Galloway D.A. [et al.] // J. Nation. Cancer Inst. — 1997. — Vol. 89. — P. 796–802.
9. Gilbert R. Toxoplasmosis / Gilbert R. // Congenital and prenatal infections. — Cambridge: University press, 2000. — P. 305–320.
10. Guidelines for Treatment of Sexually Transmitted Diseases: CDC MMWR Recommendations and Reports. — N.-Y., 1998. — Vol. 47, N RR-1. — 117 p.
11. Higa K. Varicella zoster virus infection during pregnancy, hypothesis concerning the mechanisms of congenital malformations / Higa K., Dan K., Manabe H. // Obstet. Gynecol. — 1987. — Vol. 69. — P. 214–222.
12. Inoue H. High efficiency transformation of with *Escherichia coli* plasmids / Inoue H., Nojima H., Okayama H. // Gene. — 1990. — Vol. 96. — P. 23–28.
13. Lee S.Y. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA / Lee S.Y., Rasheed A. // Biotechniques. — 1990. — Vol. 9. — P. 676–679.
14. Naot Y. Method for avoiding false positive results occurring in immunoglobulin M enzyme-linked factor and antinuclear antibodies / Naot Y., Barnett E.V., Remington J.S. // J. Clin. Microbiol. — 1985. — Vol. 21. — P. 931–935.
15. Peckman C.S. Cytomegalovirus infection, congenital and neonatal disease / Peckman C.S. // Scand. J. Infect. — 1991. — Vol. 78. — P. 82–87.
16. Peitsaro P. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique / Peitsaro P., Johansson B., Syrjänen S. // J. Clin. Microbiol. — 2002. — Vol. 40. — P. 886–891.
17. Ridgway G.L. Current problems in microbiology: 1. Chlamydial infections: which laboratory test? / Ridgway G.L., Taylor-Robinson D. // J. Clin. Pathol. — 1991. — Vol. 44. — P. 1–5.
18. Sexually Transmitted and Other Reproductive Tract Infections. A guide to essential practice. — Geneva: WHO, 2005. — 186 p.

Статья представлена И.Ю. Коганом
НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН,
Санкт-Петербург

PROBLEMS OF DIAGNOSIS AND THERAPY OF INFECTIONS
AFFECTING REPRODUCTIVE HEALTH

Savicheva A.M.

■ **Summary:** The article is devoted to some basic issues in diagnosis and treatment of infections affecting human reproduction and based on investigations conducted at the Laboratory of Microbiology, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology. The importance of 'bed-side' microscopy approach applied by a physician during a patient's visit, which enables timely diagnosis and treatment, is underlined. Some features of diagnosing infections caused by *Chlamydia trachomatis* and human papillomavirus (HPV) are highlighted. It was shown that persistence of high-risk HPV types, high viral load and integration of viral DNA into the cell genome may predict cervical neoplastic progression. Also, an algorithm of examination of pregnant women for TORCH-infections is developed.

It was emphasized that treatment of infections affecting human reproduction should be regulated by international standards. Eradication of *C. trachomatis* during therapy with josamycin ("Wilprafen®") and doxycycline ("Unidox®") was observed by the 10th day of treatment. It was concluded that 10-day duration of treatment of urogenital chlamydial infection with these antimicrobials is reasonable.

■ **Key words:** diagnostics; therapy; infections of the reproductive tract; chlamydial infection; human papillomavirus infection