

**IV Байкальский форум противодействия ВИЧ-инфекции 2016: Взгляд в будущее. Смена парадигмы.  
Актуальные вопросы лабораторной диагностики**

---

**Возможности метода ПЦР для  
диагностики инфекций,  
передаваемых половым путём**

Ольга Владимировна Дрижак, научный сотрудник  
производственно-испытательной лаборатории  
ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск

**Иркутск  
22 – 23 сентября 2016**

# Инфекции, передаваемые половым путём (ИППП)

Возбудители ИППП – более 30 различных инфекционных агентов (бактерии, микоплазмы, вирусы, грибы, простейшие...)

## Безусловные патогены:

*Chlamydia trachomatis*  
*Trichomonas vaginalis*  
*Neisseria gonorrhoeae*  
*Mycoplasma genitalium*  
*Treponema pallidum*  
*Haemophilus ducreyi*  
и другие

## Условные патогены:

*Candida albicans*  
*Gardnerella vaginalis*  
*Mycoplasma hominis*  
*Ureaplasma parvum*  
*Ureaplasma urealyticum*  
и многие другие

## Вирусы:

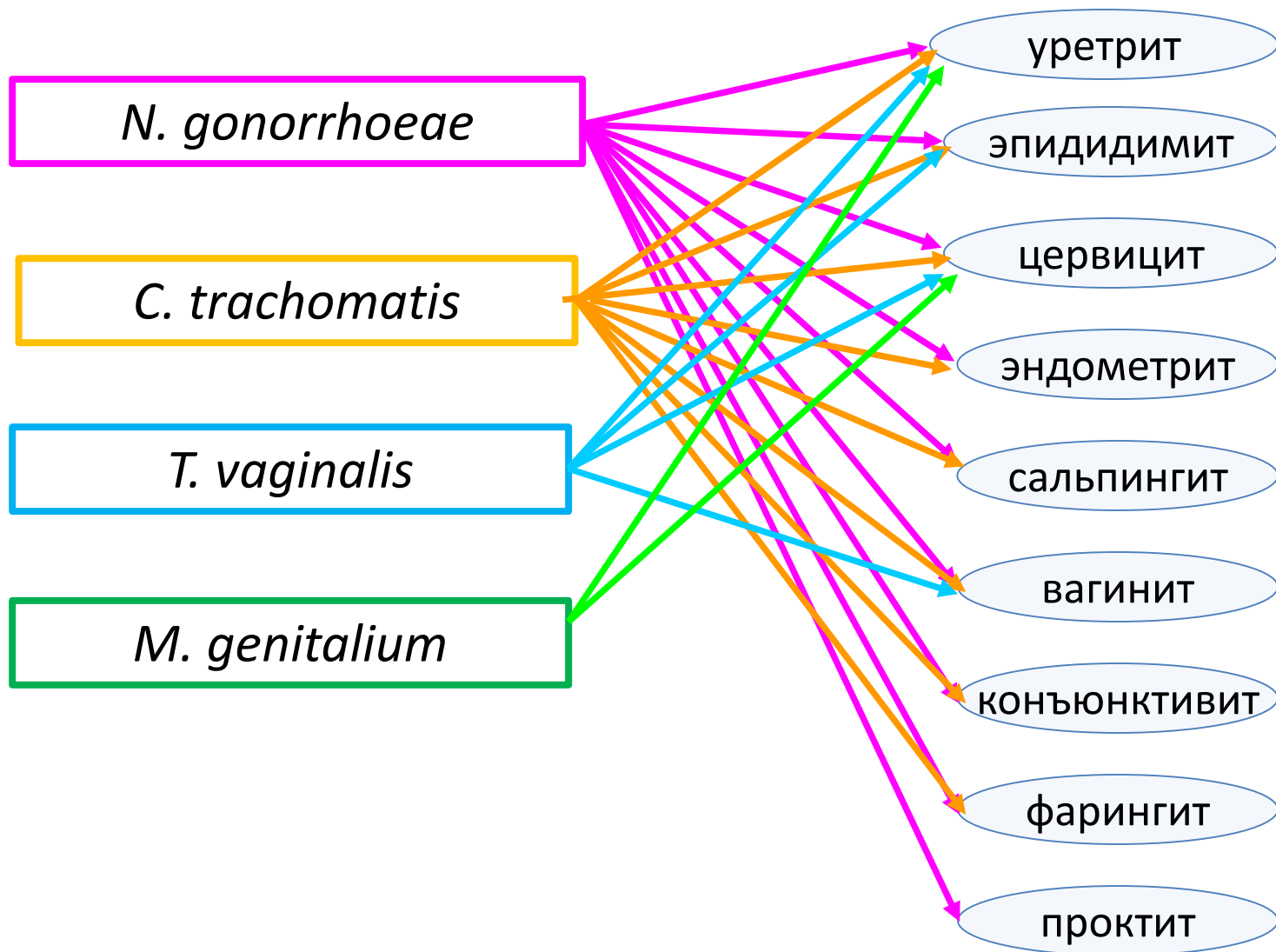
ВПЧ высокого риска  
HSV 1, 2  
CMV  
ВГВ  
ВГС  
ВИЧ

В разных странах под термином «ИППП» понимают разное! «Традиция» РФ – относить к ИППП всё, что поражает уrogenитальный тракт.

# Общие особенности ИППП

- Широкая распространённость и высокая социальная значимость
- Преимущественно половой путь передачи
- Схожая симптоматика для ряда заболеваний, вызванных различными возбудителями
- Высокая частота бессимптомного течения и хронизации
- Высокий риск развития осложнений и бесплодия при хроническом течении
- Существенная вероятность инфицирования детей внутриутробно и в родах
- Высокая частота микст-инфекций, взаимно отягощающих течение друг друга и затрудняющих диагностику и терапию

**Разные возбудители ИППП могут быть ассоциированы с одними и теми же клиническими симптомами, и наоборот**



# Диагностика и терапия урогенитальных инфекций затруднена высокой частотой микст-инфекций



## Проблемы, связанные с микст-инфицированием:

- одна из причин снижения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам
- возможно формирование синергических связей между разными видами
- разные виды чувствительны к разным группам препаратов → назначение нескольких препаратов одновременно или поэтапно
- далеко не всегда понятен этиологический фактор заболевания
- учитывая высокую распространенность условно-патогенной микрофлоры, на неё часто “списывают” причину воспалительного процесса

# Методы лабораторной диагностики

## Прямые методы

- непосредственное выявление инфекционного агента:

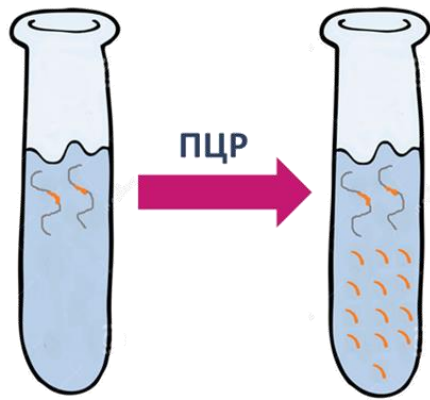
- без накоплением анализата  
Микроскопия  
ИФА, ПИФ (= выявление антигенов)
- с накоплением анализата  
Методы классической микробиологии  
**Методы амплификации НК (ПЦР, NASBA и т.д.)**

## Непрямые методы

- выявление реакции организма на присутствие инфекционного агента:

- Серологические методы (обнаружение и количественное определение антител к антигенам возбудителя, измерение авидности)
- Морфологические исследования (гисто- и цитология)

# ПЦР – полимеразная цепная реакция



- метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых количеств определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (НК) *in vitro*

*С точки зрения клинической диагностики:*

- метод выявления специфических НК (ДНК и РНК) патогенов в биопробах с малым их содержанием
- наработка участков генома, специфичных (уникальных) для конкретного рода/вида инфекционных агентов

# Преимущества метода ПЦР

- Прямое определение наличия инфекционного агента
- Высокая специфичность
- Высокая чувствительность
- Возможность использования широкого спектра биоматериала
- Высокая скорость получения результата анализа
- Возможность одновременного анализа на предмет выявления нескольких возбудителей (мультиплексирование)
- Возможность диагностики на разных стадиях заболевания (выявление острых и латентных форм)
- Возможность проведения доклинической и ретроспективной диагностики



# Применение ПЦР в диагностике ИППП

- Скрининг бессимптомных и стёртых форм
- Определение этиологии инфекционного заболевания
- Контроль эффективности терапии (важно учитывать «элиминационное окно» между окончанием терапии и контрольным анализом!)
- Количественные оценки содержания патогенов (особенно актуально для условных!)
- Определение генетических детерминант антибиотикорезистентности
- Генотипирование, выявление штаммов повышенной патогенности

ПЦР-анализ на безусловные патогены уже получил широкое распространение в России в качестве метода скрининга

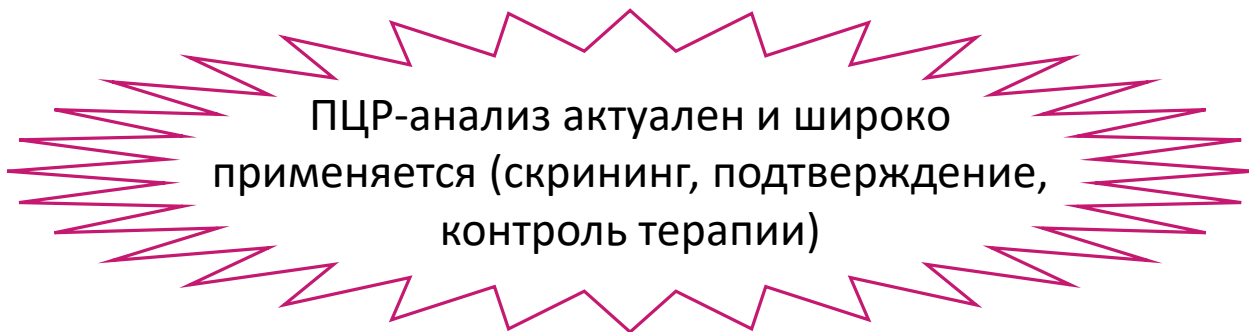
# «Тетрада» безусловных патогенов, передающихся половым путём (**CNTM**):

*C. trachomatis*

*N. gonorrhoeae*

*T. vaginalis*

*M. genitalium*



ПЦР-анализ актуален и широко применяется (скрининг, подтверждение, контроль терапии)

---

Обнаружение **CNTM** у пациента и/или его полового партнера – основание для назначения лечения одновременно обоим партнерам

Цели лечения инфекций, вызываемых **CNTM**:

- **Эрадикация патогена**
- Клиническое выздоровление
- Предотвращение развития осложнений
- Предупреждение инфицирования других лиц

# *Trichomonas vaginalis*

возбудитель урогенитального трихомониаза

Анаэробное жгутиковое простейшее, подвижно, может образовывать безжгутиковые формы. Преимущественно колонизирует УГТ, не образует цист. Возможен (хотя и редок) контактно-бытовой путь передачи.



Основные носители – женщины детородного возраста; 25-50% бессимптомное носительство, остальные –вагинит. Диагностика у женщин проще, чем у мужчин



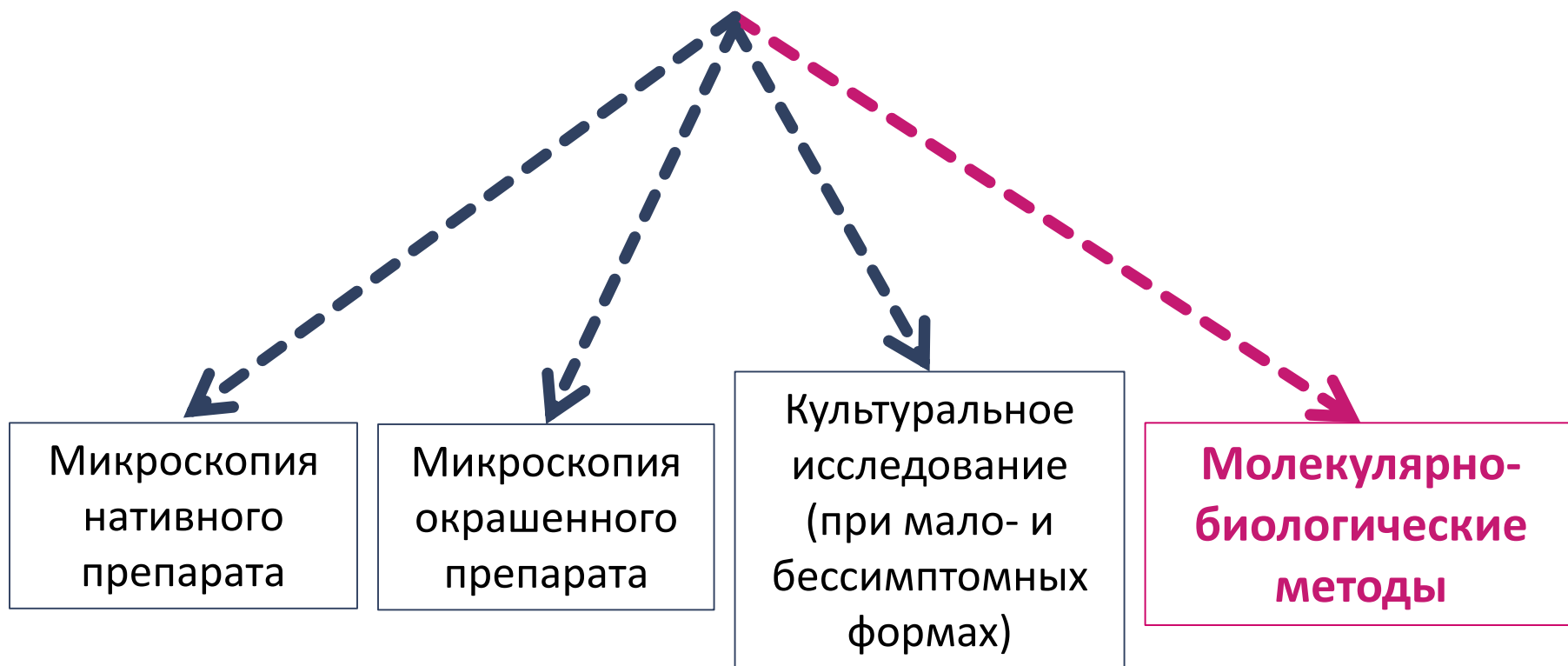
Характерно бессимптомное носительство (большинство носителей)  
Острый трихомониаз

*Симптоматика не является специфичной*

Показание к лечению – лабораторное выявление трихомонад у пациента либо его полового партнера (одновременное лечение обоих партнеров является обязательным)

В РФ за последние 5 лет отмечено снижение уровня заболеваемости с 119,5 на 100000 населения в 2006 до 112.2 на 100000 населения в 2011

# Верификация диагноза урогенитального трихомониаза базируется на обнаружении *T. vaginalis* с помощью методов:



*Клинические рекомендации по ведению больных инфекциями, передаваемыми половым путем, и урогенитальными инфекциями. Российское общество дерматовенерологов и косметологов. 2012*

# Место ПЦР в диагностике трихомониаза

## ПЦР-анализ актуален как скрининговый тест!

### Достоинства:

- высокая чувствительность, отсутствие проблем идентификации, связанных с атипичными формами (нет проблем со специфичностью)
- возможность быстрого получения результатов, относительно низкая себестоимость
- возможность одновременного выявления нескольких возбудителей
- прямое определение возбудителя
- есть удобная мишень – повторенная последовательность, присущая только этому виду, что способствует повышенной чувствительности

Возможный алгоритм анализа –  
подтверждать результаты ПЦР-скрининга культуральным методом,  
затем культуру вновь анализировать при помощи ПЦР

# *Neisseria gonorrhoeae*

грамотрицательная неподвижная бактерия

- Колонизирует мочеполовую систему (может расти на слизистых по всей длине репродуктивного тракта), аноректальную область, конъюнктиву глаза, опорно-двигательный аппарат, ротоглотку
- Может быть передана ребёнку при прохождении родовых путей матери; контактно-бытовой путь передачи окончательно не доказан

**Бессимптомное носительство в целом характерно для женщин (80%) и нехарактерно для мужчин (10%)**

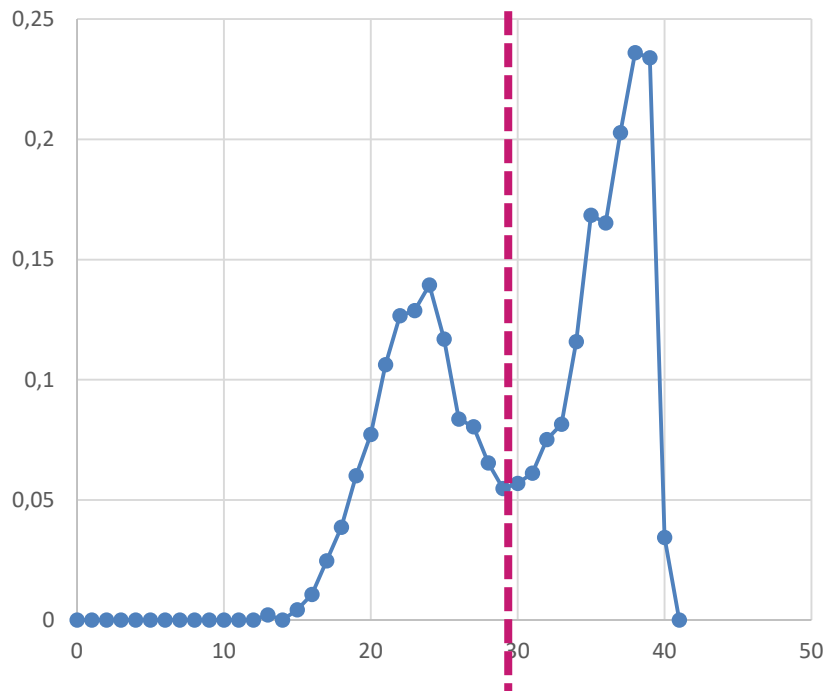
**Данные Минздравсоцразвития России:**

2009 г. 48.1/100 тыс. населения, 2010 г. 42.7/100 тыс. населения, 2011 г. 38.4/100 тыс. населения (вклад в структуру ИППП 12.6%, значительно превышает показатели для Западной Европы)

*Официальные цифры, по-видимому, близки к реальности*

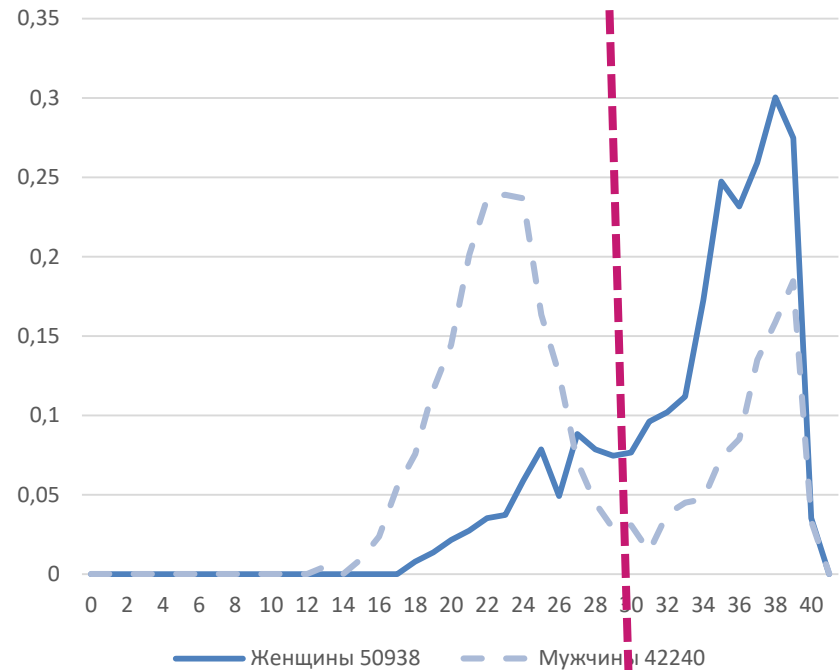
# Выявляемость ДНК *N. gonorrhoeae* наборами “РеалБест” среди пациентов Лаборатории ИНВИТРО (образцы из урогенитального тракта): распределение нагрузок совершенно различно у пациентов – мужчин и женщин

Все пациенты NG+, n=93198



~10<sup>4</sup>/соскоб

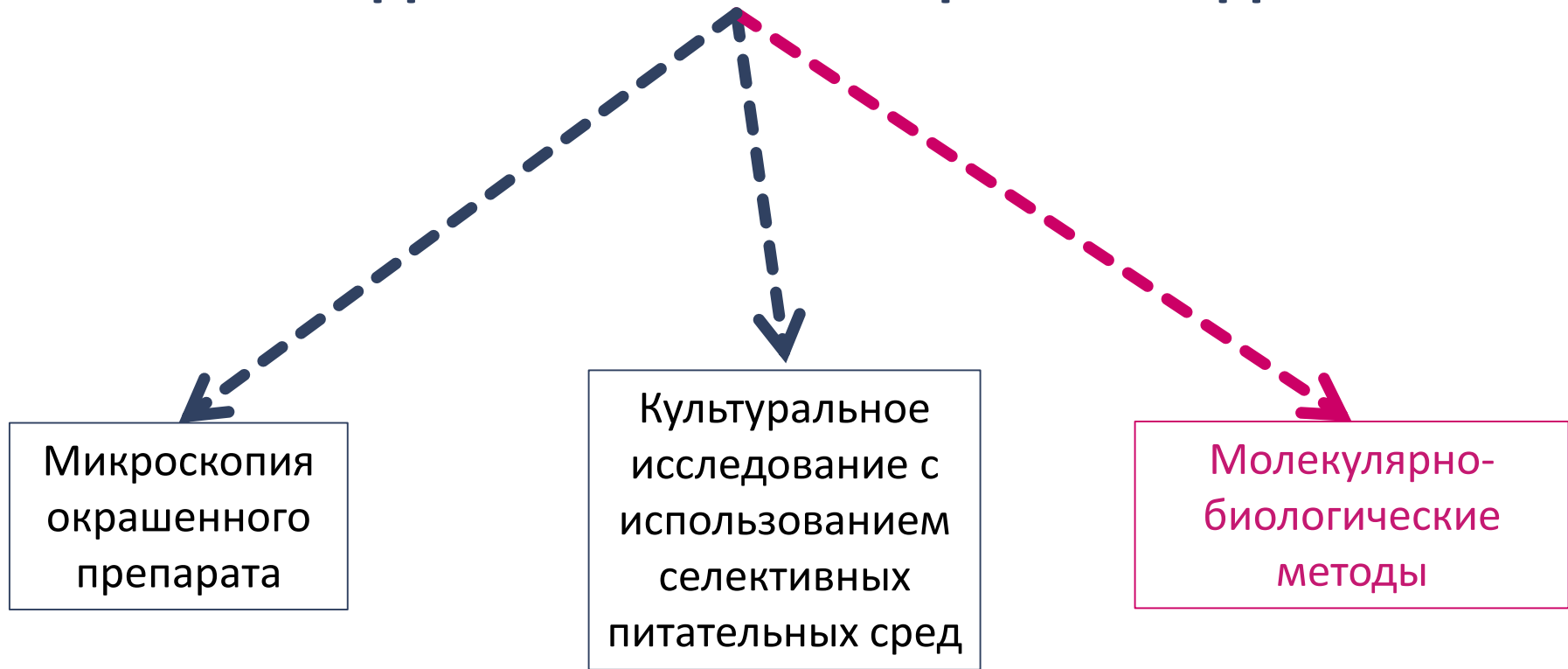
Мужчины vs женщины NG+



~10<sup>4</sup>/соскоб

Нагрузка ниже →  
← Нагрузка выше

# Верификация диагноза гонококковой инфекции базируется на результатах лабораторных исследований с помощью методов:

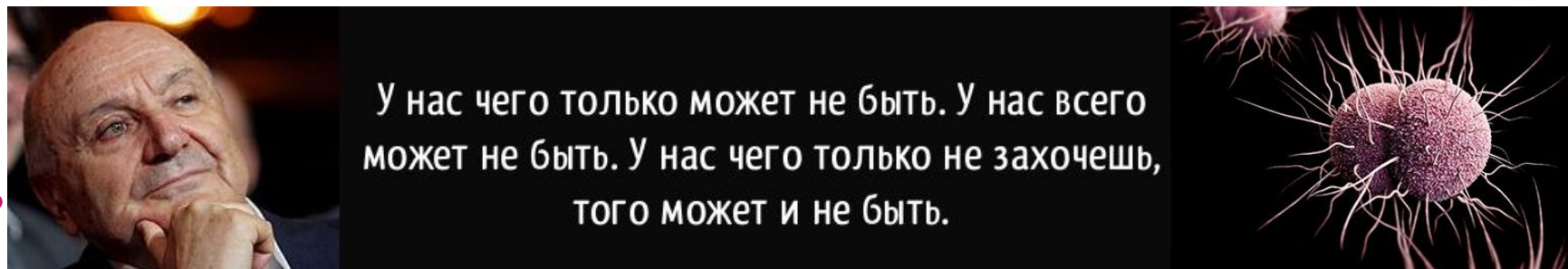


*Клинические рекомендации по ведению больных инфекциями, передаваемыми половым путем, и урогенитальными инфекциями. Российское общество дерматовенерологов и косметологов. 2012*



# Выявление ДНК *N. gonorrhoeae* – возможные причины ложных результатов:

- Наличие в образцах других видов *Neisseria* – ложно+
- Горизонтальный обмен любыми генами между разными



- Возможность утраты практически любого гена отдельными штаммами – ложно–
- Возможность микст-инфицирования разными видами *Neisseria*

**Желательно подтверждать специфичность выявления ДНК *N. gonorrhoeae* альтернативным ДНК-тестом или использовать двухлокусный тест (лучше одного того же производителя)**

# Применение ПЦР в диагностике ИППП

## Преимущества

- Прямой метод
- Высокая специфичность
- Высокая чувствительность
- Широкий спектр биоматериала
- Высокая производительность
- Мультиплексирование
- Диагностика разных стадий



## Ограничения

- Амплификация ДНК живого и погибшего патогена
- Необходимость контроля взятия образца
- Возможность перекрёстной реакции
- Изменчивость патогенов
- Сложности трактовки слабоположительных результатов
- Высокая вероятность кросс-контаминаций

# Особенности применения ПЦР в диагностике ИППП

- Высокий диагностический потенциал, в том числе в качестве метода скрининга
- Важность учёта свойств патогенов и характера заболевания
- Возможность использования двух независимых тестов (разные локусы) или проведения параллельного анализа нескольких видов биоматериала

**Необходимо достижение консенсуса в вопросах клинической и прогностической значимости ПЦР-анализа!**

# ПЦР-диагностика: преаналитический этап

**Для обеспечения качества ПЦР-анализа пробы биоматериалов должны быть взяты:**

- из места локализации инфекционного процесса / локализации возбудителя
- при наличии клинических признаков, с учётом периодов персистенции / элиминации
- с минимальным количеством посторонних примесей (возможных ингибиторов)
- только одноразовыми инструментами

# ПЦР-диагностика: преаналитический этап

## Урогенитальные соскобы (мазки):

- Должны содержать достаточное количество эпителиальных клеток - **контроль взятия материала!**
- Не должны содержать примеси (слизь, кровь, гной)
- Во избежание кросс-контаминации при взятии должен использоваться только одноразовый инструментарий
- В случае применения антибактериальных препаратов взятие образца должно осуществляться не ранее, чем через 1 месяц после окончания их приёма\*

\* Клинические рекомендации по ведению больных ИППП и урогенитальными инфекциями, 2012

# ПЦР-диагностика: преаналитический этап

## Контроль взятия материала (КВМ):

- Это ПЦР-исследование для оценки содержания эпителиальных клеток (= ДНК человека) в образце
- Позволяет оценить правильность взятия материала и исключить возможный ложноотрицательный результат
- Рекомендуется использовать при исследовании биоматериала, содержащего клетки эпителия человека (соскобы из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища, задней стенки носоглотки и других слизистых, а также клеточного осадка мочи)

# ПЦР-диагностика: преаналитический этап

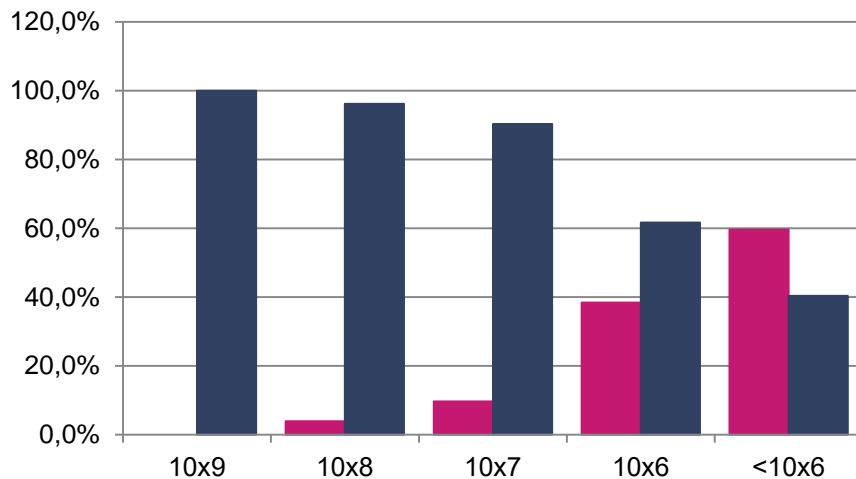
## Набор «РеалБест Валидация образца»:

- Предназначен для **количественной оценки содержания ДНК человека в клинических образцах** (*эпителиальных соскобах*) с целью **валидации качества** их взятия и **повышения достоверности результатов** ПЦР-исследований
- Основан на количественной оценке содержания участка ДНК гена **гидроксиметилбилан синтетазы (HMBS) человека**
- Результат выявления ДНК возбудителя инфекции в соскобе является достоверным при содержании в ПЦР-пробе **не менее 250 копий** ДНК гена HMBS (или  $10^4$  копий в образце)
- При содержании  $<250$  копий ДНК человека в ПЦР-пробе образец считается непригодным для ПЦР-анализа – необходимо дополнительно взять материал и провести повторный анализ

# ПЦР-диагностика: преаналитический этап

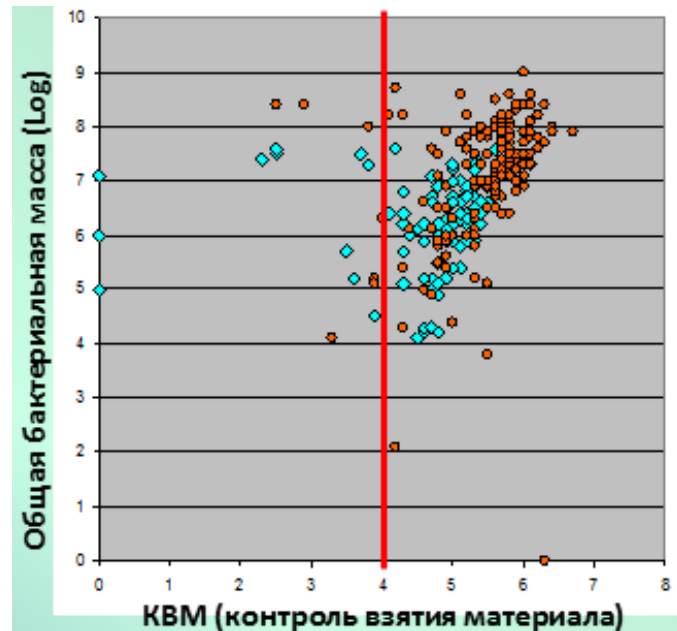
## Контроль взятия материала (КВМ):

Количество бактериальной ДНК в пробах с низким содержанием ДНК человека также снижается, что может привести к ложноотрицательным результатам



Соотношение ДНК человека и бактериальной ДНК в урогенитальных пробах (N=1200, собственные данные)  
**Маджента** – ДНК человека < 250 копий в пробе, **синие** – ДНК человека > 250

Методика взятия соскобов не поддается стандартизации: разные врачи берут материал по-разному



Зависимость количества взятого материала от врача (N=120, «Инвитро»)  
Синими и красными ромбами обозначены образцы, взятые разными врачами



# ПЦР-диагностика: преаналитический этап

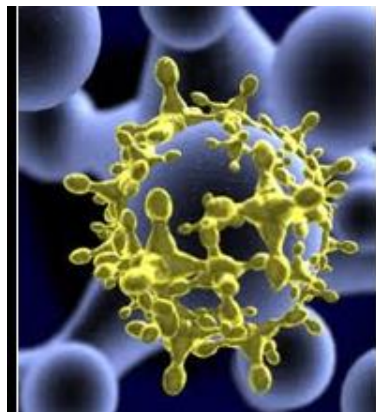
## Основные причины неудовлетворительного КВМ:

- Несоблюдение врачом техники взятия соскоба и последовательность процедур
- Несоблюдение пациентом правил подготовки к исследованию
- Индивидуальные особенности пациента:
  - состав микрофлоры влагалища зависит от фазы цикла
  - приём препаратов может приводить к низкой эпителизации влагалища
  - физиологические изменения состояния слизистой влагалища

# Наборы реагентов серии «РеалБест»

- **ИППП – безусловные патогены:** *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *M. genitalium*, *N. Gonorrhoeae* (+ подтверждающий тест), *T. pallidum* + мультиплексы
- **Условно-патогенная микрофлора:** *U. spp* – *U. urealyticum* и *U. parvum*, *M. hominis* + мультиплексы, Лактонорм (ОБМ и ЛБ), *G. vaginalis/A. vaginae*, *Prevotella spp./ Leptotrichia amnionii a.g.*, 2 вида *Mobiluncus*, TM7/BVAB2
- **Микозы:** *C. albicans*/Fungi и определение ещё 6 видов *Candida*
- **Папилломавирусная инфекция:** ВПЧ 26/53/66; 68/73/82; 16/18, 26/51, 31/33, 35/45, 52/56, 6/11, 44; генотипирование 12 типов ВПЧ ВКР (кач. и колич.)
- **РеалБест Валидация образца:** количественное определение ДНК человека в соскобе урогенитальных клеток
- **РеалБест ПЦР-12 ИППП:** комплексное обследование на 8 бактериальных и 4 вирусных инфекционных агента

# Благодарю за внимание!



# ПЦР-диагностика: преаналитический этап

## Рекомендации по взятию соскоба эпителиальных клеток урогенитального тракта для ПЦР-исследований:

- Для взятия соскоба из влагалища и цервикального канала использовать цитощётку, из уретрального канала – универсальный уретральный зонд (вводить на глубину 2 см)
- Удалять избыток слизи и обильные выделения
- Биоматериал из влагалища брать с заднего и боковых сводов, до мануального исследования
- При наличии патологических участков – брать на границе здоровой и изменённой ткани
- Крайне нежелательно брать биоматериал для цитологического исследования и ПЦР-анализа в один день («истощение слоя эпителиальных клеток»)

# ПЦР-диагностика: преаналитический этап

## Рекомендации по подготовке пациента перед взятием соскоба:

- За 24 часа до взятия биоматериала не следует:
  - проводить спринцевание (накануне и в день взятия)
  - проводить кольпоскопию и УЗИ с применением вагинального датчика
  - иметь половой акт
- Не рекомендуется проводить взятие биоматериала из цервикального канала и влагалища во время менструального кровотечения\*
- Взятие биоматериала из уретры должно проводиться не ранее, чем через 3 часа после последнего мочеиспускания, при наличии обильных уретральных выделений – через 15-20 минут после мочеиспускания\*

\* Клинические рекомендации по ведению больных ИППП и урогенитальными инфекциями, 2012