

Ю.В. Трусов

Цервицит

Пособие для врачей

18+

Юрий Трусов

Цервицит

«ЛитРес: Самиздат»

2020

Трусов Ю. В.

Цервицит / Ю. В. Трусов — «ЛитРес: Самиздат», 2020

ISBN 978-5-532-06736-3

Представленный материал отражает современное представление о причинах инфекционного и неинфекционного цервицита, его диагностике, вариантах течения и наиболее целесообразной терапии на основе данных доказательной медицины. Пособие предназначено для врачей акушеров-гинекологов.

ISBN 978-5-532-06736-3

© Трусов Ю. В., 2020
© ЛитРес: Самиздат, 2020

Содержание

1.ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ЦЕРВИЦИТОВ	7
Конец ознакомительного фрагмента.	28

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БВ – бактериальный вагиноз
ВЗОМТ – воспалительные заболевания органов малого таза
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
ВМС – внутриматочная спираль
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
ВПГ – вирус простого герпеса
ВПЧ – вирус папилломы человека
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ЗТ – зона трансформации
ИППП – инфекции, передающиеся половым путём
ИФА – иммуноферментный анализ
ИФН – интерферон
ЛПС – липополисахарид
ЛПУ – лечебно-профилактическое учреждение
МАНК – метод амплификации нуклеиновых кислот
МПЭ – многослойный плоский эпителий
ПИФ – прямая реакция иммунофлюоресценции
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РТ – ретикулярные тельца
РИФ – реакция иммунофлюоресценции
РНИФ – реакция непрямой иммунофлюоресценции
РСК – реакция связывания комплемента
УЗИ – ультразвуковое исследование
ЦМВ – цитомегаловирус
ЦЭ – цилиндрический эпителий
ЭТ – элементарные тельца

ВВЕДЕНИЕ

Настоящее учебное пособие имеет структуру, отражающую различие во врачебной тактике при цервицитах.

Первый («традиционный») подход распространён как в России, так и за рубежом и предусматривает лечение цервицита после лабораторной идентификации возбудителя этого заболевания. Последняя напрямую зависит от свойств микроорганизма, поэтому методы диагностики причины цервицита рассмотрены в разделе о его этиологической структуре. Причём при описании молекулярно – биологических методов выявления хламидий дана характеристика всем известным МАНК. Не меньше внимания уделено методу ИФА, получившему широкое распространение в деятельности ЛПУ.

Несмотря на то, что лечением гонореи и трихомоноза занимаются венерологи, рост частоты этих заболеваний за рубежом и уменьшение частоты их встречаемости в России, стёртость и атипичность их современного течения позволяют предположить, что акушеры – гинекологи ослабили профессиональное внимание к выявлению этих нозологических форм. Отдельный акцент сделан на оппортунистических цервицитах, когда сам факт выделения вирусного, микоплазменного, уреоплазменного характера цервицита или его реализация при кандидозе указывает на наличие выраженного вторичного иммунодефицита у пациентки и подвигает к проведению комплексной антибактериально – иммунокорректирующей терапии.

Сторонники второго (эмпирического) подхода считают нецелесообразным проводить лабораторную идентификацию возбудителя, а назначают лечение сразу с перекрытием спектра наиболее часто встречающихся возбудителей цервицита, прежде всего, хламидий и гонококков. Мотивируется эта позиция, прежде всего клинической основой диагноза «цервицит», эпидемиологическими данными, экономической выгодой и лёгкостью лечения для пациента (короткий курс – разовый приём). В России такой принцип пробного лечения (лечения, действующего на предполагаемую причину заболевания) известен давно и используется для диагностических целей. В настоящее время, прежде всего, в США он оформился в самостоятельный методический подход в лечении цервицитов.

При рассмотрении лечения в заключительном разделе особое внимание уделено иммунорекции у пациенток с цервицитами в силу их доказанной эффективности.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

В Малой медицинской энциклопедии (1991-1996) цервицит (*cervicitis*; лат. *cervix, cervicis* – шея, шейка + *-itis*) определяется как воспаление шейки матки.

1. ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ЦЕРВИЦИТОВ

1.1. *Chlamydia trachomatis*

Хламидии близки по структуре и химическому составу к классическим бактериям. Для них характерно сохранение морфологической сущности на протяжении всего жизненного цикла, деление вегетативных форм, наличие клеточной стенки, содержание ДНК и РНК, энзиматическая активность, чувствительность к антибиотикам широкого спектра действия, наличие общего родоспецифического антигена.

В то же время, хламидии по размерам меньше классических бактерий, имеют небольшой геном, являются облигатными внутриклеточными паразитами с уникальным циклом развития. Они не способны синтезировать высокоэнергетические соединения и обеспечивать собственные энергетические потребности, что и определяет их облигатный паразитизм.

Морфологические особенности. Клеточный цикл развития хламидий имеет две основных формы – *элементарные тельца* (ЭТ) – инфекционная форма и *ретикулярные тельца* (РТ) – вегетативная форма. ЭТ значительно меньше РТ по размеру (менее 300 нм в диаметре), имеют более жесткую электронно – плотную структуру, метаболически малоактивны, адаптированы к кратковременному внеклеточному существованию.

Цикл развития хламидий осуществляется в цитоплазматическом включении – *фагосоме* (вакуоли), куда ЭТ попадают путем стимулирования эндоцитоза. В процессе адсорбции и эндоцитоза (7 – 10 часов) участвуют термолabileзные эффекторные белковые поверхностные антигены хламидий. ЭТ подавляют фагосомо – лизосомальное слияние и преобразуются в течение 6 – 8 часов при участии главного поверхностного протеина в РТ. Последние обладают активным метаболизмом, более крупными размерами и активным бинарным делением. Репродукция хламидий на протяжении 18 – 24 часов осуществляется в цитоплазматическом пузырьке, образованном из мембраны клетки хозяина, вмещающем в себя от 100 до 500 ЭТ. Далее в течение 36–42 часов происходит процесс созревания РТ через переходные (промежуточные) тельца в ЭТ следующего поколения. Полный цикл развития хламидии равен 48–72 часам и завершается разрушением пораженной клетки. В случае возникновения неблагоприятных метаболических условий этот процесс затягивается, могут образовываться L – формы.

Культуральные свойства. Для выращивания хламидий используются ткани лабораторных животных и куриные эмбрионы, особенно, линии клеток McCoу чаще с обработкой цитостатиками для повышения их чувствительности.

Биохимические свойства. *Chlamydia trachomatis* способна самостоятельно синтезировать нуклеиновые кислоты, некоторые белки и липиды, является энергетически зависимыми от хозяина эндопаразитом, обладает гликоген – синтетазной системой (гликоген содержится и выявляется при определенных методах окраски во включениях), синтезирует предшественники фолиевой кислоты и в соответствии с биохимической активности чувствительна к сульфаниламидам.

Антигенная структура. 1. Хламидии выделяют *поверхностный родоспецифический антиген* (по химическому составу – липополисахарид), локализующийся на наружной мембране клеточной стенки. Он имеет две антигенные детерминанты, одна из них специфична для всего рода, другая перекрестно реагирует с некоторыми другими грамотрицательными бактериями (сальмонеллы серовара minnesota), термостабилен. 2. МОМР (Major Outer Membrane Protein) – *главный белок наружной мембраны* хламидий исполняет роль структурного белка и *порина*, включает термолabileзные белковые детерминанты, обладающие видо – , типом – и сероварной специфичностью.

Детерминанты патогенности. 1. Эндотоксин (липополисахарид), подобный эндотоксинам грамотрицательных бактерий. 2. Экзотоксины – термолабильные субстанции. 3. Антигены клеточной поверхности, подавляющие защитные реакции. Факторы патогенности хламидий препятствуют фагосомо – лизосомальному слиянию в фагоцитатах.

Краткая эпидемиологическая характеристика. В крупных странах (США, Россия) ежегодно регистрируют несколько миллионов случаев заболеваний, вызываемых *Chlamydia trachomatis* сероваров D – K, в мире – от 50 до 90 млн. случаев. Этот возбудитель передаётся от человека к человеку половым путем, от матери к плоду при его рождении. Бессимптомное носительство наблюдается не менее чем у 10% женщин. При беременности инфицировано 7% женщин.

Распространение инфекции:

а) каналикулярно, то есть через цервикальный канал, полость матки, маточные трубы на брюшину и органы брюшной полости (в распространении хламидий могут участвовать сперматозоиды);

б) лимфогенно – по лимфатическим капиллярам;

в) гематогенно – о чем свидетельствуют экстрагенитальные поражения (глотка, суставные сумки).

Лабораторная идентификация.

Цитологический метод – окраска препаратов из клинических материалов по Романовскому-Гимза, по Гименезу, по Макиавелли, окраска раствором Люголя. Для постановки предварительного диагноза хламидиоза достаточно обнаружить одно типичное цитоплазматическое включение. Одновременно учитывается количество лейкоцитов как показателя воспаления, а также дополнительная информация о наличии сопутствующей бактериальной микрофлоры (дрожжеподобных грибов, трихомонад и т.п.). Чувствительность метода составляет 10-20%.

Культуральный метод – выделение хламидий на клеточных линиях L-929, Mc Coy, HeLa, куриных эмбрионах и др. Для его осуществления необходима быстрая транспортировка клинического материала на холоде ($6+2^{\circ}\text{C}$), чтобы сохранить жизнеспособность находящихся в нём хламидий. Кроме того, выделение последних не стандартизировано и продолжительно, затруднено при использовании пациенткой смазок, спринцеваний, спермицидов или при заборе материала для исследования тампоном, содержащим вату, дакрон. Чувствительность метода, по данным разных авторов, колеблется в пределах 40 – 70%, но специфичность метода остается 100%. Результаты культурального исследования получают через 2-3 дня. Последний считается положительным, если обнаруживается хотя бы одно хламидийное внутрицитоплазматическое включение и нет причин подозревать контаминацию другим положительным образцом.

Иммунологические методы.

Прямая иммунофлюоресценция (ПИФ): выявление антигенов хламидий путем обработки препаратов мечеными флюоресцеином моноклональными антителами к родоспецифическим и видоспецифическим антигенам этого инфекционного агента и люминисцентной микроскопии: на красном или оранжевом фоне цитоплазмы эпителиальных клеток определяются округлые яблочно-зеленые элементарные тельца 200-300 нм. Требуется более 5 клеток цилиндрического эпителия в одном поле зрения. Диагностическая ценность ПИФ связана с тем, что с ее помощью выявляются не только корпускулярные, но и растворимые антигены хламидий. Этот метод не зависит от возможного изменения тинкториальных свойств микроорганизма в процессе заболевания и лечения. При использовании моноклональных антител результат считают положительным при наличии 10 ЭТ в поле зрения или хотя бы одного внутриклеточного включения. ПИФ – важный скрининговый метод диагностики хламидиоза. Чувствительность

и специфичность метода составляют, соответственно, 55-76% и 98%. Чувствительность метода низкая при малых количествах элементарных телец в препарате.

Непрямая иммунофлуоресценция (НИФ) применяется в тех случаях, когда нет в наличии антихламидийных антител. В этих случаях приготовленный тем же методом, что и для ПИФ препарат из клинических проб обрабатывают вначале антихламидийными антителами, полученными путем иммунизации хламидиями овец, кроликов, мышей или других животных, а затем второй сывороткой, специфичной для вида животного, которое было иммунизировано хламидиями. Антитела второй сыворотки конъюгированы с ФИТЦ. Показания к применению и специфичность данного метода совпадают с ПИФ.

Иммуноферментный анализ для определения антигена (ИФА-АГ) хламидий с использованием моноклональных антихламидийных антител варьирует от прямого обнаружения антигена до захвата антигена с использованием или без использования ферментной амплификации с целью увеличения чувствительности метода. Чувствительность и специфичность метода – от 20 до 85% и зависят от вида тест-системы и перекрёстного реагирования с липополисахаридом (антигеном) других микроорганизмов. Результат исследования определяют с помощью специальных ридеров, позволяющих определять оптическую плотность образца при определенной длине волны (обычно – при 492 нм). Образцы, дающие значения оптической плотности выше или равные значениям отсекающего поглощения (cut-off), считаются положительными.

Иммунохроматографический анализ и ферментоспецифическая реакция выявляют в исследуемом материале антигены хламидий у постели больного (Bed Side) при скрининговых исследованиях: накопление в зоне учета результатов реакции иммунных комплексов, содержащих метки, приводит к образованию окрашенной полосы (розового цвета различной интенсивности), учитываемой визуально. Широкое применение тестов ограничивается ввиду недостаточно высокой чувствительности и специфичности по сравнению с методами амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) хламидий.

Метод выявления антител к *S. Trachomatis* (серологический). ИФА на наличие антител: антиген фиксируется на твердой поверхности, обрабатывается испытуемой сывороткой, а затем антивидовым иммуноглобулином, связанным с ферментом, визуализирующимся после добавления субстрата. Следует учитывать, что у некоторых людей иммунный ответ на урогенитальную хламидийную инфекцию может быть отсрочен или даже отсутствовать после инфицирования. В случаях, где иммунный ответ есть, антитела часто сохраняются в течение длительного времени после выздоровления. По этим причинам для диагностики отдельных случаев хламидиоза этот метод не рекомендуется, но может быть использован при оценке фазы заболевания путём регистрации определённых классов иммуноглобулинов к специфическому хламидийному липополисахариду: первичная / острая (Ig G, Ig A, Ig M), хроническая (Ig A, Ig G), реактивация или реинфекция (Ig A, Ig M), состояние после реконвалесценции (Ig G). Следует учесть, что при недостоверном определении титра IgA подтверждение осуществляется при помощи определения Ig M. IgM является маркером острой стадии заболевания и определяется уже через пять дней после его начала. В течение 10–ти дней после появления патологических симптомов происходит смена IgM на IgA, незначительное время могут одновременно присутствовать Ig M и Ig A. В это же время или с небольшой задержкой в 2–3 недели могут быть определены и IgG. Переход в хроническую стадию болезни характеризуется появлением Ig A, Ig G- антител.

Для адекватной интерпретации результатов серодиагностики хламидиоза следует определять такое понятие как “пограничные титры”. Это – наименьшие возможные разведения, в которых тест-системы определяют антитела против хламидии. “Пограничные титры” для IgM – 1:50, IgA – 1:50, IgG – 1:100. Так называемые “диагностические титры” могут подтверждать клинический диагноз, стадию процесса, необходимость назначения антибактериального лечения (табл.1). При реинфекции и реактивации происходит скачкообразный подъем

титров IgG, изменения титра IgA идут параллельно с титром IgM, однако на более низком уровне. У лиц, не получающих в период реинфекции лечения, титр IgG сохраняется на неизменном уровне. Выявление на протяжении длительного периода титра только IgG указывает на состояние реконвалесценции после перенесенной хламидийной инфекции (“серологические шрамы”). Исследуя титры антител IgG, IgA, IgM, можно оценивать эффективность проведенного лечения в отдаленном периоде (через 1–1,5 месяца).

Таблица 1

Диагностический диапазон титров антител IgG, IgA, IgM при хламидиозе

Стадия заболевания

Диапазон титров IgG

Диапазон титров IgA

Диапазон титров Ig M

Первичная/острая

Определяются Ig M

>100–6400

> 50–1600

> 50–3200

Хроническая

Определяются Ig A

>100–1600

>50–200

<50

Реактивация/Реинфекция

Определяются Ig G, IgA

>100–51200

>50–400

<50

Состояние после Реконвалесценции

Определяется IgG

>100–400

<50

<50

Молекулярно – биологические методы – методы на основе амплификации (лат. *amplificatio* – усиление, увеличение), нуклеиновых кислот: процесс образования дополнительных копий участков хромосомной ДНК сигнала, мишени и зонда.

При использовании методов амплификации сигнала, в ходе реакции увеличения концентрации мишени или зонда не происходит. Значительное повышение аналитической чувствительности метода достигается за счет связывания с мишенью множества меченых молекул.

Один из вариантов этого подхода (hybrid capture assay – **метод захвата гибридных молекул**) используется в коммерческих тест-системах для выявления *S. trachomatis*. Метод основан на гибридизации в растворе ДНК-мишени и РНК-зонда. Образовавшиеся гибридные молекулы захватываются иммобилизованными антигибридными антителами. Затем к иммобилизованным гибридным молекулам присоединяются антигибридные антитела, меченные щелочной фосфатазой. Реакция оценивается по интенсивности люминесценции, ее высокая чувствительность определяется тем, что к одной гибридной молекуле (ДНК+РНК) присоединяется множество молекул меченых антител.

Аmplификация зонда. При использовании этих методов продукт амплификации представлен только нуклеотидными последовательностями, входящими в состав зонда. Наиболее известным вариантом этого метода является **лигазная цепная реакция**.

Аmplификация мишени. Все методы, относящиеся к этой группе, основаны на проведении энзиматических реакций, в процессе которых один или несколько ферментов синтезируют множественные копии нуклеиновой кислоты – мишени.

Классическая ПЦР. Амплификация ДНК-мишени осуществляется в ходе повторяющихся циклов, каждый из которых включает денатурацию ДНК-мишени при температуре более 900С, отжиг на каждой одноцепочечной молекуле ДНК комплементарного праймера (олигонуклеотида) при понижении температуры до 550С – 650С, достройку двухцепочечной молекулы ДНК с каждого праймера в результате энзиматической активности термостабильной ДНК-полимеразы. По окончании цикла происходит удвоение фрагментов ДНК-мишени. Для детекции продуктов амплификации используются электрофоретический и гибридизационно-флуоресцентный методы.

ПЦР в реальном времени позволяет предотвратить перекрестную контаминацию исследуемых образцов, которая свойственна классической ПЦР, благодаря её высокой чувствительности. Для детекции продуктов амплификации разработаны технологии, основанные на комплексе ферментативных реакций, в результате которых в реакционной смеси возникает флуоресцентный сигнал, пропорциональный количеству образовавшегося продукта амплификации. ПЦР в реальном времени может быть использована для определения количественного содержания ДНК-мишени в биологическом образце.

Методы амплификации, основанные на транскрипции, реализуются при постоянной температуре, а мишенью является РНК хламидий. На начальных этапах реакции при участии обратной транскриптазы на матрице РНК – мишени происходит синтез комплементарной ДНК. Затем с помощью РНК полимеразы синтезируются множественные копии РНК. В настоящее время распространены амплификация, основанная на транскрипции (ТМА – Transcription Mediated Amplification) и амплификация, основанная на последовательности нуклеиновых кислот (NASBA – Nucleic Acid Sequence Based Amplification), различающиеся происхождением используемых в реакциях ферментов и методами детекции продуктов амплификации.

Метод амплификации со смещением цепочки относится к изотермическим, концептуально сложен, но технически прост в исполнении и наиболее часто используется для детекции не только хламидий, но и гонококков. Следует заметить, что в Скандинавии появились варианты *S. trachomatis*, у которых в результате мутации отмечено отсутствие участка криптической плазмиды *S. trachomatis*, являющейся мишенью для данного метода.

Таким образом, для постановки диагноза урогенитальной хламидийной инфекции рекомендуется использовать валидные и разрешенные к применению методы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) и не рекомендуются использование культурального метода и методов основанных на выявлении антигенов хламидий или антител к ним, экспресс-тесты у постели больного. Наиболее информативным может быть клинический материал, если он получен при наличии клинических признаков заболевания, отсутствии

использования лекарственных препаратов местно минимум в течение последних 48 – 72 часов, в середине менструального цикла в дни, когда нет кровянистых выделений.

Если, например, при ПЦР в реальном времени обнаруживается 469 копий / мл и выше, то концентрация хламидий считается диагностически значимой и назначается этиотропная и иммунокорректирующая терапия. В противном случае (при концентрации хламидий 100 – 498 копий / мл) результат исследования признаётся сомнительным и требуется применение культурального метода. В последнем случае окончательно решается: есть инфицирование хламидиями или нет. При этом скрининговые методы (ИФА, ПИФ) могут выступать при положительной детекции хламидий своеобразными «поставщиками» клинических образцов для дальнейшего исследования МАНК. Последние решают проблему низкой чувствительности культурального метода, но не могут его заменить при определении чувствительности хламидий к антибиотикам.

Получение клинического образца. Оптимальным для присутствия и размножения хламидий являются определенные участки цилиндрического эпителия: слизистая оболочка цервикального канала на глубине 1,5 см. При взятии материала из этой зоны ключевым моментом является удаление слизистой пробки. От тщательности проведения этой подготовительной процедуры во многом зависит правильность соскоба клеток цервикального канала. Слизистую пробку удаляют ватным тампоном и пинцетом, а затем берут материал специальной щеточкой cervix brush / voba-brush или ложечкой Фолькмана. Для получения репрезентативного результата важно присутствие в образце клеток со всей поверхности цервикального канала и зоны трансформации. Щеточка вводится в канал на 1–2 см и вращается 15 секунд .

Забор материала у девочек производится со слизистой оболочки преддверия влагалища, в отдельных случаях – из заднего свода влагалища через гименальное кольцо.

Наличие в образцах выделений и примесей крови маскирует хламидии и затрудняет диагностику.

Изменения иммунного статуса. В настоящее время доказано, что при хламидиозе начинают развиваться следующие защитные иммунологические реакции:

- локальное образование секреторного иммуноглобулина А;
- цитотоксическая защита посредством Т-лимфоцитов;
- образование антител классов IgM, IgA, IgG к хламидийному липополисахаридному антигену.

Изменения показателей иммунитета системы при острых хламидийных цервицитах, как правило, неотчетливы. При хронизации и распространении процесса (сальпингит) они приобретают стойкий характер.

В общем анализе крови отмечается снижение уровня нейтрофилов и повышение содержания эозинофилов. При исследовании клеточного звена иммунитета непрямой иммунофлюоресцентным методом с помощью моноклональных антител, определении концентрации IgG А,М методом радиальной иммунодиффузии могут выявляться следующие нарушения: в гуморальном звене – снижение IgG и IgA при снижении относительного содержания клеток СД 72 (В-лимфоцитов). Дисбаланс клеточного звена иммунитета выражается в достоверном снижении клеток СД4 (относительное содержание), тенденции к повышению СД8, очевидно, за счет роста цитотоксических клеток и, как следствие, снижение иммунорегуляторного индекса. Факторы неспецифического иммунитета характеризуются значительным повышением относительного содержания популяции естественных киллеров, а также недостаточной функциональной активностью фагоцитарной системы.

Для акушера – гинеколога знание иммунологических нарушений необходимо для обоснованного назначения иммуномодулирующих препаратов, в частности, оказывающих стимулирующее действие на нейтрофильно-фагоцитарное и Т-клеточное звено иммунитета. Необходимо осуществлять индивидуальный подбор иммуномодуляторов на основании изучения

функциональной активности полиморфноядерных лейкоцитов системы фагоцитоза методом люминолзависимой хемолюминесценции (ЛЗХЛ). Основанием для назначения того или иного препарата является максимальное по сравнению с другими повышение активности фагоцитов, детектируемое амплитудой вспышки ЛЗХЛ в момент внесения данного препарата в исследуемую пробу крови.

Чувствительность к антибиотикам. Проницаемость клеточных мембран для большинства антибиотиков низкая, их концентрация внутри клетки не достигает того уровня, который создается в крови. Латентность и тенденция к внезапному проявлению свежих поражений характерны для хламидийной инфекции как до лечения, так и после него за счет сохранения жизнеспособных элементов хламидий внутри эпителиальных клеток аналогично тому, как они сохраняются в культуре клеток, подвергнутой действию антибиотика. После нескольких пассажей на свежих клеточных культурах снова появляются внутриклеточные включения из сохранившихся жизнеспособных телец. Персистенция хламидий в организме у части больных в течение ряда лет, несмотря на проведенное лечение, свидетельствует о том, что у разных больных курсы лечения антибиотиками дают разные результаты, в особенности при осложненных формах. Применяются тетрациклины, макролиды, фторхинолоны.

1.2. *Neisseria gonorrhoeae*

Морфологические особенности. *Neisseria gonorrhoeae* – диплококки, напоминающие по форме кофейные зерна или бобы, прилегающие друг к другу уплощенными сторонами. Для них характерно наличие капсулы, а также пилей и ворсинок, облегчающих адгезию к эпителию. Субстрат для колонизации этим микробом – эпителий уретры, прямой кишки, конъюнктивы глаза, глотки, шейки матки, маточных труб и яичника. Они обладают полиморфизмом, образуют L-формы, хорошо красятся метиленовым синим или бриллиантовым зелёным. При антибиотикотерапии, хронической гонорее и в некоторых других случаях как морфологические признаки, так и отношение к окраске по Граму может изменяться.

Культуральные свойства. Очень прихотливы к условиям культивирования и питательным средам. Для выращивания гонококков требуются среды с кровью, сывороткой крови или асцитической жидкостью человека. Оптимальная температура +37° С, рН – 7,2-7,4. Нужна повышенная концентрация CO₂, селективные компоненты, подавляющие рост сопутствующей микрофлоры. Колонии, как правило, вырастают через 18-24 ч, однако возможен и поздний рост.

Биохимические свойства. Гонококки ферментируют только глюкозу с образованием кислоты без газа. Изменённые формы, в том числе L-формы, могут вообще не ферментировать углеводы. Протеолитическую активность не проявляют, аммиак, сероводород и индол не образуют, не приводят к гемолизу на средах, содержащих кровь. Штаммы гонококка, вызывающие диссеминированные инфекции, нуждаются в аргинине, гипоксантине и урациле (так называемые АНУ+ штаммы). Бактерии отличаются устойчивостью к бактерицидному действию сывороточных IgM и IgG, а также комплемента.

Антигенная структура очень изменчива: характерны фазовые вариации (исчезновение антигенных детерминант) и антигенные вариации (изменение антигенных детерминант). Основную антигенную нагрузку несут детерминанты пилей и поверхностных белков. По наличию пилей гонококки разделяются на пять типов (Т1-Т5): типы Т1 и Т2 снабжены пиллями (Р+ и Р++), окружены капсулой и вирулентны, бактерии прочих типов авирулентны. Белок I составляет до 60% вещества клеточной мембраны и его идентификация составляет основу серотипирования гонококков и распознавания бактерий методом ИФА. Белок II определяет специфические клинические проявления заболевания. Бактерии, содержащие белки I и II обычно выделяют при поражениях мочевыводящих путей, а штаммы, содержащие белок I, но лишённые белка II – при диссеминированных поражениях. С высокой антигенной изменчивостью

связано отсутствие иммунной защиты против повторного заражения. Наибольшее антигенное родство – с менингококками.

Факторы патогенности. Основными факторами являются *пили*, с помощью которых гонококки осуществляют адгезию и колонизацию эпителиальных клеток слизистой оболочки мочеполювых путей, и *липополисахарид* (эндотоксин, освобождающийся при разрушении гонококков). Гонококки синтезируют IgA – протеазу, расщепляющую IgA. Характерна генетическая изменчивость, даже на протяжении жизни одной микробной популяции. Передача информации осуществляется преимущественно конъюгацией. Выявлены F- и R- плазмиды, в т.ч. плазмиды, несущие ген бета – лактамазы.

Краткая эпидемиологическая характеристика. Источник гонорей – больной человек часто с малосимптомными или хроническими формами или гонококконоситель. Основной путь заражения гонореей – половой, возможно инфицирование плода при прохождении через родовые пути матери. При орогенитальных контактах может быть поражение глотки, миндалин, слизистой рта. Возможны супер – и реинфекции.

По данным ВОЗ, ежегодно в мире регистрируют до 200 млн вновь заболевших гонореей. В России после некоторого снижения заболеваемости в 90-е годы XX столетия вновь отмечено увеличение количества больных до 102,2 на 100 тыс. населения. Общеизвестно, что заболеваемость населения, по крайней мере, в 2 раза выше официально зарегистрированной, поскольку гонорея протекает бессимптомно у 3-5% инфицированных, а также в статистические отчеты могут не попадать случаи заболевания, зарегистрированные в коммерческих центрах и пропущенные при нарушении алгоритма лабораторной диагностики.

Социальная значимость гонорей определяется не только ее частотой, но и последствиями, которые она вызывает, и в первую очередь бесплодием. Число больных достигает максимума в летне-осенний период (июль, август, сентябрь), соотношение больных гонореей мужчин и женщин составляет 1,5:2,0. Возросла заболеваемость гонореей среди молодежи в возрасте 15-19 лет. Чаще стали встречаться ассоциированные инфекционные поражения мочеполового тракта (29-80%), гонорейные поражения прямой кишки (наблюдаются у 35-40% женщин), слизистых оболочек рта и глотки (регистрируются у 45-95% женщин, имеющих орогенитальные контакты).

В случаях одновременного заражения гонореей и другими инфекциями удлиняется инкубационный период гонорей, изменяется клиническое течение заболевания и затрудняется клиническая и лабораторная диагностика.

Гонококки, попав на слизистую оболочку, постепенно распространяются по ее поверхности (*per continuitatem*). Они проникают также в лимфатические щели и сосуды, а затем переносятся в отдаленные от места проникновения отделы мочеполового тракта. Такой путь распространения возбудителя подтверждается быстрым развитием аднекситов, очаговым поражением уретральных желез, окруженных густой сетью лимфатических сосудов.

Возможна гематогенная диссеминация с образованием гонококковых метастазов в различных органах. Несомненное значение в происхождении ряда осложнений имеет ретроградный путь заноса возбудителя (проникновение инфекции в полость матки при антиперистальтических движениях, а затем в маточные грубы и в брюшную полость и яичники).

Лабораторная идентификация. Метод световой микроскопии окрашенных (метиленовым синим или по Граму) препаратов выступает широко используемым простым отборочным тестом. Определяются расположенные парами внутри сегментоядерных лейкоцитов кокки бобовидной формы, в слизи, на поверхности эпителия.

В начале клинических проявлений при скудном слизисто-гнойном отделяемом из цервикального канала гонококки обнаруживаются преимущественно на поверхности эпителиальных клеток в виде кокков, реже – тетракокков. В разгаре заболевания при обильном гнойном отделяемом из цервикального канала, внутриклеточные диплококки доминируют. По мере

снижения остроты процесса число внутриклеточных гонококков уменьшается и увеличивается их количество на поверхности эпителиальных клеток. Характерным для гонореи является незавершенная фагоцитарная реакция, при которой микроорганизмы находят благоприятные условия для внутриклеточной персистенции. Кроме полинуклеаров, в фагоцитозе принимают участие макрофаги, эпителиальные клетки, а также лимфоциты. Последние обладают миграционным циклом и способствуют генерализации инфекции.

Только три признака вместе: форма (диплококки в форме кофейного зерна), локализация (преимущественно внутри лейкоцитов и на эпителиальных клетках), грам-принадлежность – позволяют предположить наличие гонококковой инфекции, но не констатировать ее.

Под влиянием антибиотиков и других химиопрепаратов а также при хронической гонорее морфология и окраски гонококков могут меняться. Отдельные клетки приобретают различную форму и величину (так называемые формы Аша). Кроме того, в исследуемом материале могут находиться подобные гонококкам грамотрицательные кокки из рода *Veillonella*. Чувствительность метода микроскопии препаратов отделяемого из цервикального канала 37-50%.

С целью повышения частоты нахождения гонококков в мазках при первичной микроскопии и более надежного выделения чистых культур особенно в случаях вялого, хронического течения заболевания прибегают к методам провокации (искусственного обострения) гонореи, в результате чего в выделениях появляется большее количество гонококков. Основными из этих методов являются: а) химический – смазывание канала шейки матки 2-5% раствором нитрата серебра; б) механическое – введение прямого бужа в уретру на 10 мин, или проведения передней уретроскопии; в) биологический – внутримышечное введение гоновакцины в количестве 500 млн. микробных тел или пирогенала 25 мкг; г) алиментарный – употребление соленой, острой пищи; д) термический – индуктотермия половых органов; физиологический – взятие мазков во время менструаций. Еще лучше комбинировать несколько методов провокации, например, химический, алиментарный и биологический.

Для снижения вероятности ложных результатов рекомендуют проведение повторной микроскопии.

Культуральный метод для видовой идентификации гонококка, позволяющего выделить чистую культуру микроорганизма и идентифицировать ее по морфологическим и биохимическим признакам. Ответ по результатам посева выдается через 5 дней после взятия пробы.

В процессе роста гонококки вырабатывают фермент – цитохромную оксидазу. Колонии гонококка окрашиваются в розовый, а затем в красный цвет и черный цвет уже через несколько минут после воздействия диметилпарафенилендиамина. Окраска происходит даже в тех случаях, когда колонии гонококка находятся под колониями других микроорганизмов.

Гонококковые колонии всегда оксидазоположительные, но оксидазоположительными могут быть и другие бактерии, вырабатывающие в процессе своей жизнедеятельности цитохромную оксидазу, например, непатогенные нейсерии. Поэтому такие колонии микроорганизмов обязательно нужно исследовать при окраске по модифицированному способу Грама. Некоторые штаммы *N. gonorrhoeae* (ауксотипы), нуждаются в дополнительных веществах при культивировании на питательных средах.

Чувствительность метода в большой степени зависит от качества взятия образца, транспортировки проб и условий культивирования и при однократном посеве может не достигать 40%. При этом в России однократный отрицательный ответ при микроскопии и посеве нередко служит основанием для выдачи окончательного отрицательного ответа.

Иммунологические методы. Метод прямой иммунофлюоресценции пригоден для дифференцирования гонококков в культуре и менее информативен при исследовании мазков, приготовленных из отделяемого очагов поражения. Иммуноферментный анализ не обладает большой информативностью. Серологические методы диагностики гонореи не позволяют раз-

личить перенесенную и текущую инфекцию. Перекрестнореагирующие антитела к *Neisseria meningitidis* служат причиной ложноположительных результатов. Поэтому серодиагностике свойственна очень низкая предсказательная ценность отрицательного результата.

МАНК имеют преимущества перед культуральными и микроскопическими методами: более высокая чувствительность как при наличии симптомов, так и при бессимптомном течении инфекции у женщин, возможность использования образцов, полученных неинвазивным путем, быстрота и автоматизация процесса диагностики. Доказана его эффективность для одновременной детекции гонококков и хламидий. Они направлены на обнаружение специфических фрагментов ДНК и/или РНК гонококков с использованием тест-систем, разрешенных к применению в России, но пока не определены порядок их проведения и требования к выполнению исследований. Тем не менее, МАНК, используемые для диагностики гонококковой инфекции, имеют некоторые существенные ограничения, например, более высокую стоимость, риск контаминации и ингибирования, в большинстве случаев неоптимальную специфичность и, что, наиболее важно, отсутствие возможности получения данных об антибиотикорезистентности микроорганизма. Ложноотрицательный результат дают штаммы с продукцией β -лактамаз. Описаны случаи ложноположительного результата при тестировании образцов, содержащих *N. Subflava*. Для исключения ложноотрицательных результатов из-за присутствия в материале ингибиторов амплификации требуется постановка контролей. Положительный результат теста в экстрагенитальном материале при низком уровне заболеваемости гонореей на территории требует подтверждения другим методом.

В настоящее время в Российской Федерации, не рекомендовано использовать МАНК как единственный метод диагностики гонококковой инфекции.

Лабораторные критерии диагноза гонореи, принятые Европейским союзом (2002), включают обнаружение грамотрицательных внутриклеточных диплококков в мазках, выделение *N. gonorrhoeae* культуральным методом, определение антигена или нуклеиновой кислоты *N. gonorrhoeae*.

Получение клинического образца.

Перед взятием материала из уретры больная не должна мочиться в течение 4-5 ч, не употреблять антимикробные препараты и дезинфицирующие растворы. Наружное отверстие уретры сначала протирают стерильным ватным тампоном, смоченным 0,85% раствором хлорида натрия, затем сухим тампоном. Мазки изготавливают из материала, взятого путем соскоба со слизистой уретры бактериологической петлей или ложечкой Фолькмана. При незначительных выделениях необходимо сделать предварительный массаж уретры.

Шейку матки сначала протирают сухим стерильным ватным тампоном для удаления слизистой пробки. Выделения из канала шейки матки берут бактериологической петлей или пинцетом.

Материал из дистального отдела прямой кишки берут с помощью ложечки Фолькмана слепым методом", т.е. без какой-либо подготовки больного, или с помощью ректоскопа или ректального зеркала. В этом случае изучаемый материал забирают непосредственно из видимого места поражения.

Принимая во внимание высокую чувствительность гонококков к колебаниям температуры, исследуемые материалы доставляют в лабораторию в специальных термосах или сумках с грелкой.

Особенности иммунологического статуса. У человека нет врожденного иммунитета к гонококкам. Нет и приобретенного иммунитета у лиц, переболевших гонореей, поэтому возможно повторное заражение. Тем не менее, в организме больных гонореей происходят иммунологические нарушения. Они более выражены при хронической гонорее по сравнению со свежей. Прежде всего происходит угнетение неспецифических факторов естественного иммунитета, выражающееся в снижении бактерицидной активности сыворотки, в уменьшении

содержания лизоцима, комплемента и др. На 5-7-й день болезни появляются противогонококковые антитела (комплемент-связывающие, агглютинины, опсонины, преципитины и др., относящиеся к классу Ig G), титр которых постепенно нарастает и достигает максимального уровня на 14-й день, а затем количество их быстро падает и спустя 6 месяцев они полностью исчезают. Антитела, относящиеся в основном к классу Ig G и в меньшей степени к Ig A и Ig M, обнаружены в отделяемом уретры и шеечном секрете. Однако образовавшиеся антитела не могут предупредить повторное заражение и возникновение осложнений.

Чувствительность к антибиотикам. Используют пенициллины, цефалоспорины, аминокликозиды.

1.3. *Trichomonas vaginalis*

Морфология и физиология. Клетки паразитов имеют грушевидную форму, длина их составляет 20-36 мкм. На переднем конце расположены 4 жгутика, отходящих от базальных зерен. Через всю цитоплазму, от области базальных зерен до конца клетки, проходит опорная эластичная нить (аксостиль). Ядро сферической формы расположено в передней части клетки. У основания имеется щелевидное углубление («жгутиковый карман»), через которое происходит захват пищи (бактерий) посредством фагоцитоза, возможно осмотическое питание. В цитоплазме иногда видны пищевые вакуоли, содержащие бактерии. Отдельные виды трихомонад отличаются также друг от друга строением ундулирующей мембраны. Размножаются трихомонады агамно, продольным делением. Быстро перемещающиеся при помощи жгутиков и ундулирующей мембраны. Стадия цисты отсутствует. Хорошо растут на питательных средах в присутствии бактерий, которыми питаются. Разработаны среды для выращивания безбактериальных культур трихомонад, что позволило изучить антигенные свойства и вирулентность различных штаммов. Отдельные виды трихомонад различаются серологически.

Патогенез и иммунитет. *T. vaginalis* вызывает воспалительный процесс во влагалище, шейке матки, уретре и других органах (трихомоноз). Нередко отмечается бессимптомное носительство паразита. Повторные заболевания трихомонозом свидетельствуют об отсутствии иммунитета.

Факторы патогенности: адгезия к эпителиальным клеткам и выделение цистеинпротеиназ.

Краткая эпидемиологическая характеристика. Публикуемые данные по распространенности урогенитального трихомоноза в различных популяциях варьируются в широких пределах, от 1% до 60%. Кроме того, у 10-80% женщин болезнь протекает бессимптомно или малосимптомно, а клиническая картина часто неспецифична. *T. vaginalis*, передается преимущественно половым путем, т.е. является венерическим заболеванием. В редких случаях (при антисанитарных условиях) заражение происходит через постельное белье. Во внешней среде паразиты быстро погибают, а в моче больной сохраняются до 24 ч. Инкубационный период – 7—10 дней, иногда 1 мес. Специфическая профилактика отсутствует.

Возраст заболевших женщин отличен от такового среди больных хламидийной и гонококковой инфекцией: если для хламидийной и, в меньшей степени, гонококковой инфекций пик заболеваемости составляет 15-25 лет, то в случае трихомонадной инфекции он приходится на более поздний возраст – 40-50 лет, что необходимо учитывать при скрининге. Причём случаи инфицирования женщин фиксируются в 4 раза чаще, чем мужчин.

Лабораторная идентификация. Согласно рекомендациям ВОЗ, используются микроскопический и культуральный методы (см. таб.2).

Таблица 2

Характеристика методов микроскопической и культуральной диагностики урогенитального трихомоноза

Микроскопия

нативного

препарата

При увеличении микроскопа x100, затем x400.

Трихомонады в виде грушевидных подвижных клеток.

При увеличении x400 видны жгутики.

Большое количество полиморфноядерных лейкоцитов (при увеличении x100).

Микроскопия

препарата,

окрашенного

метиленовым

синим

При увеличении микроскопа x1000.

Наличие большого количества лейкоцитов и трихомонад подтверждает диагноз.

Культуральная

диагностика

Сбор содержимого уретры или влагалища в пробирки с питательной средой. Посев на среду должен проводиться в момент взятия материала.

Посев при +35-37°C 24-72 часа.

Микроскопическое исследование «нативного» препарата является наиболее доступным методом микробиологической диагностики трихомониаза. При этом принципиально важно проводить исследование непосредственно после взятия образца (в пределах 10–20 минут), во избежание снижения или потери подвижности возбудителем. В исключительных случаях для транспортировки препарат следует поместить в атмосферу «влажной камеры» в чашку Петри с увлажненной фильтровальной бумагой и немедленно, не допуская охлаждения, доставить в лабораторию.

Процедура исследования заключается в том, что на предметном стекле смешивают каплю теплого стерильного физиологического раствора с образцом и, накрыв покровным стеклом, немедленно исследуют с помощью обычного светового, фазово-контрастного или темнопольного микроскопа. В препарате выявляют трихомонады по их характерной подвижности,

которую важно не спутать с подвижностью иного рода. Поэтому метод пригоден для выявления только активно подвижных трихомонад. При выполнении последнего условия специфичность метода приближается к 100 %, а при попытках идентификации малоподвижных или неподвижных трихомонад резко возрастает количество ложноположительных результатов. С помощью микроскопического исследования нативного препарата удастся выявить от 6 % до 82 % больных трихомониазом. Чувствительность метода во многом зависит от количества возбудителя в образце. Так, если концентрация возбудителя ниже 10^4 организмов/мл, тест его не выявляет. Кроме того, показано, что из первоначально положительных в этом тесте образцов через 10 минут экспозиции 20 % из них становились отрицательными.

Микроскопическое исследование окрашенного препарата не требует немедленного просмотра препарата, позволяет лучше изучить как морфологию трихомонад, так и другие элементы. Однако метод менее чувствителен и специфичен, а также более трудоемок. Частота

обнаружения трихомонад в клинических материалах, полученных от пациентов с трихомониазом, помещенных на предметное стекло и окрашенных анилиновыми красителями, может составлять 30–62%. В препаратах, окрашенных по Граму, Лейшману, Романовскому–Гимзе, метиленовым синим по Леффлеру Т. *Vaginalis* не всегда выявляется в типичной грушевидной форме. Во время фиксации и окрашивания препаратов трихомонады теряют свои морфологические особенности, что приводит к диагностическим ошибкам при микроскопическом исследовании. Чувствительность этого метода не превышает 60 %, специфичность – 95%.

Метод люминесцентной микроскопии при окрашивании препаратов акридиновым оранжевым используется редко. Также предложен метод окраски трихомонад по Филду, позволяющий различать живых и погибших паразитов с выявлением характерной ультраструктуры возбудителя.

В нашей стране диагностика трихомониаза осуществляется преимущественно методом микроскопического исследования окрашенных препаратов (в основном, метиленовым синим и по методу Грама), диагностические характеристики которого невысоки.

Культуральный метод с применением жидких или полужидких питательных сред в настоящее время считается «золотым стандартом» диагностики трихомониаза. К достоинствам культурального метода следует отнести его высокую специфичность (100 % при условии выявления активно подвижных трихомонад) и низкий порог чувствительности, составляющий от 10 паразитов/мл до 300–500 паразитов/мл образца, который во многом определяется качеством используемых питательных сред. Чувствительность культурального метода по сравнению с МАНК варьируется от 35 % до 96 %, в зависимости от качества транспортных и культуральных питательных сред и условий культивирования. Метод не лишен некоторых ограничений, таких как трудоемкость и длительный срок культивирования (от 2 до 7 дней с ежедневным микроскопическим исследованием), высокие требования к условиям транспортировки и хранения клинических образцов. Контаминация проб микроорганизмами может потребовать дополнительных пассажей, увеличивающих срок и стоимость исследования. Пассаж (пересев) через 2–3 дня культивирования снижает бактериальную контаминацию и может потребоваться для окончательной идентификации *T. vaginalis*. Трихомонады способны вступать в медленную фазу роста, и даже в чистой культуре иногда может наблюдаться задержка роста от 24 до 48 часов, прежде чем проявится характерный рост организма.

Трихомонады относят к факультативным анаэробам, они аэротолерантны, при их культивировании предпочтительны микроаэрофильные условия. Исследования качества различных сред показали, что к числу самых оптимальных относятся среды Hollander, Diamond-modified и CPLM, с чувствительностью до 96 %; однако, вышеперечисленные питательные среды отличаются высокой стоимостью.

Метод с использованием клеточных культур, в частности клеток линии McCoу, способен определять *T. vaginalis* в концентрациях менее 3 организмов в 1 мл вагинального отделяемого. В опытах *in vitro* показано, что *T. vaginalis* тропны к клеткам эпителия влагалища, по сравнению с другими типами клеток. Однако выделение трихомонад в культуре клеток – это не простой рутинный метод, он дорогой и трудоемкий.

Очевидно, оправданным можно считать опыт ряда зарубежных стран

(Англия и другие), где практикуется одновременное проведение микроскопического и культурального исследования материала при клинико-лабораторном обследовании пациента с подозрением на хламидийный цервицит и вагинит, что повышает качество диагностики и сокращает сроки обследования.

Иммунологические методы

Ограничения микроскопического и культурального методов исследования оказали стимулирующее влияние на внедрение альтернативных методов диагностики трихомониаза. К их

числу относятся иммунологические методы, как для выявления антигенов *T. vaginalis*, так и для выявления антитрихомонадных антител.

Среди серологических тестов для определения антител к *T. vaginalis* в настоящее время безусловным лидером как по диагностическим характеристикам, так и по простоте исполнения, является иммуноферментный анализ (ИФА). В работе таких систем имеется ряд недостатков, обусловленных зависимостью иммунного ответа от различных факторов, характеристиками тест-систем, свойствами возбудителя. Чувствительность этих тестов составляет в среднем 82%, специфичность – 73%.

Поскольку антитрихомонадные антитела могут циркулировать в сыворотке крови в течение длительного времени после лечения, то дифференцировать таким образом текущую и перенесенную ранее инфекцию проблематично. Отсутствие адекватной модели с использованием лабораторных животных для исследования иммунного ответа при трихомониазе является серьезным ограничением для изучения возможностей серологического метода. Установлена корреляция наличия антитрихомонадных антител и онкологической патологии.

Для выявления антигенов *T. vaginalis* разработано несколько тестов. Как правило, чувствительность тестов для выявления антигенов трихомонад выше, чем чувствительность микроскопического метода исследования «нативного» препарата, но уступает (или сопоставима с ней) чувствительности культурального метода исследования. Бесспорным преимуществом данных тестов, по сравнению с традиционными методами диагностики трихомониаза, является то, что для интерпретации результатов исследования

не нужны живые трихомонады.

Прямое определение специфических белков *T. vaginalis*, таких как клеточный разъединяющий фактор (cell-detaching factor, CDF) и цистеин-протеаза (cysteine protease), являющихся иммуногенами всех наблюдавшихся

изолятов *T. vaginalis*, с использованием моноклональных антител в качестве быстрого метода диагностики трихомониаза показало результаты, аналогичные результатам метода микроскопии «нативного» препарата. Прямой иммуноферментный и иммунофлюоресцентный анализ выявления антигенов трихомонад в клинических материалах, полученных из влагалища, с использованием коммерческих тест-систем *Trichomonas*, использующий смесь меченных пероксидазой и флюорохромом моноклональных антител к различным структурам *T. vaginalis*, показали аналитические характеристики, сравнимые с культуральным методом. Достоинством данного теста является также то, что результаты тестирования становятся доступны в течение одного часа. *T. vaginalis* может быть обнаружена методом прямой иммунофлюоресценции в отделяемом влагалища, а также иммунопероксидазным методом при цитологическом исследовании фиксированных цервикальных проб. Данные методы имеют достаточно высокую чувствительность (79–90%) и специфичность (98–100%) по сравнению с культуральным методом. Недостатком иммунологических методов является то, что для их выполнения требуются специальное оборудование; кроме того, эти методы достаточно дороги.

Для детекции *T. vaginalis* существует ряд методов определения их антигенов и предназначены для женщин с клиническими симптомами, что делает их неинформативными для других пациентов. Последнее поколение данных тестов – быстрый тест для выявления трихомонад.

В отечественной клинической практике пока «вспомогательными» остаются иммунологические и молекулярно-генетические методы лабораторной диагностики влагалищных трихомонад, направленные на выявление либо видоспецифичных антигенных маркеров *T. vaginalis* (экспресс-тест), либо консервативных нуклеотидных последовательностей, характерных для *T. vaginalis* (например, часть гена бета-тубулина, повторяющийся фрагмент TV-E650 и др.), и отличающих их от иных простейших и других частых «сателлитных» возбудителей ИППП – *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis* (с применением ПЦР- и ЛЦР-технологий).

ПЦР-тестирование (при условии использования высокоспецифичных и качественных праймеров) сегодня является, пожалуй, единственным надежным способом видовой дифференциации *T. vaginalis* от трихомонад других видов (*T. tenax*, *T. hominis*), которые в связи с изменением в последнее время стереотипов сексуального поведения (промискуитет, гомосексуальные, оральные-генитальные и анально-генитальные контакты) могут быть обнаружены в образцах из урогенитального тракта, ротовой полости или прямой кишки. Несмотря на свой высокий диагностический потенциал, ПЦР-типирование *T. vaginalis* по нормативным документам пока не относится к категории арбитражных методов.

Получение клинических образцов. Для выявления *T. vaginalis* у женщин наиболее подходит материал из влагалища. Мазок с заднего свода берут дакроновым или вязким тампоном на пластиковом стержне. Ватные тампоны на деревянных стержнях подходят для микроскопии и инокуляции в культуру, но не подходят для экспресс-тестов и МАНК. Поэтому, чтобы не путаться, рекомендовано не применять зонды с ватой. Производить забор материала пациентки могут самостоятельно, либо это могут делать врачи до размещения влагалищного зеркала в ходе гинекологического осмотра.

Также для МАНК на *T. vaginalis* подходит материал (из влагалища, шейки матки, моча), оставшийся при сборе анализов на хламидии или гонококки.

Чувствительность к химиопрепаратам. Редко встречаются, но описаны изоляты *T. vaginalis* с пониженной чувствительностью и резистентностью к метронидазолу (который обычно выступает первой линией терапии) и тинидазолу (вторая линия терапии). Тем не менее, в некоторых популяциях резистентность к метронидазолу обнаруживают в 2-5% случаев трихомониаза у женщин.

Оппортунистические инфекции

Особенности оппортунистических инфекций – полиэтиологичность, полиорганность, склонность к генерализации процесса, малая специфичность клинических проявлений. В их развитии играют роль как экзогенные возбудители (микоплазмы и др.), так и представители резидентной микрофлоры (эндогенные микроорганизмы), а также состояние иммунной системы организма.

Основными формами оппортунистических инфекций являются: гнойно – воспалительные процессы, бактеремия, сепсис, бактериальный эндотоксический шок, дисбактериозы (дисмикробиоценозы – дисбиозы).

Если патогенные микроорганизмы вызывают классические инфекции, то условно – патогенные микроорганизмы вызывают инфекции у лиц с нарушениями иммунного статуса (оппортунистические инфекции). В зависимости от этиологии и патогенеза иммунодефицита манифестируют различные инфекции и инвазии. При дефиците гуморального иммунитета преобладают бактериальные инфекции, при преимущественном клеточном иммунодефиците – вирусные, протозойные и грибковые.

В современной патологии человека предполагается этиологическая роль около 100 видов условно-патогенных микроорганизмов. Основное значение среди них имеют представители следующих родов: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Acinetobacter*, *Bacteroides*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Pneumocysta*.

На модели СПИД из большого числа известных оппортунистических инфекций установлен стандартный перечень 13 оппортунистических (иммунодефицит – индикаторных) инфекций, вызываемых простейшими (*Toxoplasma gondii*, *Isospora belli*, *Cryptosporidium* spp.), грибами (*Pneumocystis carinii* отнесены к бластомицетам – почкующимся дрожжеподобным грибам; *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides*

immitis), бактериями (*Salmonella* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complex), вирусами (*Herpes simplex*, *Cytomegalovirus hominis*). По данным многих авторов, примерно у половины больных СПИДом в клинике доминирует пневмоцистная пневмония, у четверти – саркома Капоши (предположительно вызывается вирусом герпеса человека 8 типа – ВГЧ8), часто проявляются инфекции, вызываемые различными герпес-вирусами, кандидоз.

Таким образом, если при клинике цервицита определяется микст – инфекция, в том числе кандидозная, герпетическая, микобактериальная, то естественным будет суждение врача о том, что цервицит протекает в организме с выраженным иммунодефицитом. При этом обращает на себя внимание крайняя таксономическая разнородность инвазий (вирусы, бактерии, грибы) и двуликость форм инфекционного процесса – латентное бессимптомное течение (чаще при улучшении иммунного статуса) или склонность к распространению (при прогрессировании иммунодефицита, например, при беременности).

Развитие и течение оппортунистических инфекций (лат. *opportunus* – склонный к заболению) определяются тремя группами факторов: свойствами возбудителя, состоянием макроорганизма и внешней среды. Со стороны возбудителя решающее значение в возникновении инфекции имеет высокая и гетерогенная по патогенности инфицирующая доза возбудителя и наличие у него определенного набора факторов вирулентности. Со стороны организма человека – нарушение целостности покровов и, что наиболее существенно, иммунодефицитные состояния. Значение окружающей среды связано с наличием факторов передачи возбудителя от инфицированного человека не инфицированному.

Возбудители оппортунистических инфекций не имеют строго выраженного органного тропизма, вследствие чего один и тот же вид может вызвать различные нозологические формы. В свою очередь одна и та же нозологическая форма заболевания (пневмония, сепсис и др.) может быть вызвана любым условно-патогенным микроорганизмом.

Оппортунистические инфекции часто вызываются ассоциацией микроорганизмов. Смешанные, или микст-инфекции, возникают в результате одновременного, а чаще последовательного заражения человека несколькими видами возбудителей.

Клиническая картина оппортунистических инфекций малоспецифична. Она зависит в большей мере от локализации поражения, чем от вида возбудителя. Для этих инфекций характерно хроническое течение. В основе хронизации лежит иммунодефицит, а также смена вариантного или видового состава возбудителей в течение болезни.

Эти же факторы обуславливают склонность оппортунистических инфекций к генерализации, развитию септикопиемии.

К особенностям оппортунистических инфекций относится так же сложность лечения, которая связана с множественной устойчивостью возбудителей к антимикробным препаратам, недостаточной активностью факторов неспецифической защиты, а также слабым иммунным ответом организма больного на антигены возбудителя. В связи с этим главным принципом лечения оппортунистических инфекций является сочетанное применение препаратов микробицидного действия и иммуностимулирующей терапии. Вместе с тем оппортунистические инфекции отличаются от заболеваний, вызванных облигатно-патогенными микроорганизмами, такими эпидемиологическими особенностями, как широкое распространение в больничных стационарах, частые случаи эндогенной инфекции.

В диагностике оппортунистических инфекций решающими являются микробиологические методы исследования. В их задачу входит установление возбудителя (возбудителей) болезни, определение иммунологического статуса больного, выяснение источника и факторов передачи возбудителей.

В установлении этиологии заболевания основное значение имеет выделение чистой культуры возбудителя из патологического материала. Однако выделение культуры условно-патогенного микроорганизма от больного еще не подтверждает его участия в развитии патологиче-

ского процесса, поскольку большинство условно-патогенных микроорганизмов обитают у всех или большинства здоровых людей.

Поэтому при диагностике оппортунистических инфекций в качестве обязательного предусмотрен количественный критерий, под которым понимают количество колониеобразующих клеток выделяемого вида микроорганизма в 1 мл исследуемого материала.

1.4. Virus herpes simplex

Морфологические и биохимические особенности. Вирионы обладают сферической формой с диаметром 140-210 нм. Нуклеокапсид окружен внешней оболочкой. Капсид построен из 162 капсомеров. Геном вируса представлен линейной двунитовой ДНК, которая состоит из двух ковалентно связанных между собой фрагментов, различных по величине и нуклеотидному составу, содержится около 80 генов.

В составе вириона обнаружено более 300 белков. Кроме того, в инфицированных клетках находится еще около 20 вирусоспецифических белков, которые не входят в состав вирусных частиц. Во внешней оболочке содержатся гликопротеины.

Антигены. Гликопротеины внешней оболочки являются типоспецифическими антигенами, позволяющими дифференцировать отдельные серотипы вирусов герпеса в реакциях нейтритализации, иммунофлюоресценции, РСК. Белки нуклеокапсида в основном несут группоспецифические антигенные эпитопы, одинаковые для отдельных вирусов герпеса, патогенных для человека или животных. Их выявляют в реакциях преципитации в иммунодиффузии.

Культивирование и репродукция. ВПГ – 2 размножается во многих различных тканевых культуральных системах: в монослоях эпителиальных клеток почек кролика, обезьяны, амниона человека, куриного эмбриона. Его цитопатогенное действие может проявляться на 2-3 день, когда отдельные клетки начинают округляться и появляются гигантские клетки, содержащие 100 ядрышек. В этот период можно видеть внутриядерные включения.

Вирусы герпеса проникают в чувствительные клетки путем рецепторного эндоцитоза, в процессе которого утрачивают внешнюю оболочку. Освободившийся нуклеокапсид транспортируется в ядро, где происходит его депротенинизация. Транскрипция вирусной ДНК происходит при участии клеточных транскриптаз, а ее репликация – с помощью вирусоспецифической ДНК-полимеразы. Структурные белки транспортируются в ядро, где образуются нуклеокапсиды. Формирование вируса заканчивается в процессе почкования через модифицированные участки ядерной мембраны, когда нуклеокапсид покрывается внешней оболочкой. Синтез вирусов герпеса происходит на фоне резко ослабленного макромолекулярного синтеза компонентов клетки хозяина. В ядрах инфицированных клеток формируются вирусспецифические эозинфильные включения, состоящие из кристаллизирующихся капсидов.

Краткая эпидемиологическая характеристика. ВПГ-2 поражает преимущественно лиц, которые достигли половой зрелости, передаваясь половым путем с развитием генитального герпеса, а также новорожденных, которые инфицируются при прохождении через родовые пути матери. Кроме того, ВПГ-2 нередко встречается при раке шейки матки.

Лабораторная идентификация. Материалом для лабораторного анализа может служить содержимое везикул, соскоб со дна эрозии, цервикального канала. Получение инфицированных клеток для проведения цитологического исследования и реакции иммунофлюоресценции (РИФ) достигается нанесением полученного от больной материала на стекло и высушивания его на воздухе. Для выделения ВПГ на культуре клеток, выполнения иммуноферментного анализа (ИФА) (для выявления антигена) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) биологическое отделяемое помещается в пробирки, содержащие стерильный раствор среды 199 (для работы

на культуре клеток) или физиологический раствор (для проведения ПЦР), в которых доставляется в лаборатории.

При цитологическом исследовании мазок после фиксации спиртом и окрашивания гематоксилином и эозином рассматривается в световом микроскопе с целью обнаружения многоядерных гигантских клеток с внутриядерными включениями.

При РИФ мазки после фиксации охлаждённым ацетоном, помещают в чашку Петри с увлажнённой фильтровальной бумагой на дне, наслаивают на мазок разведённые флюоресцирующие иммуноглобулины, выдерживают в термостате, промывают, высушивают и рассматривают в люминисцентном микроскопе. Обращают внимание на характер и количество антигенсодержащих клеток, локализацию специфического свечения и его интенсивность. Положительным считается мазок, в котором содержится не менее 3 морфологически неизменных клеток эпителия с интенсивной специфической флюоресценцией типичной локализации не менее чем ++. Для ВПГ – 2 характерна локализация антигена в ядре, ядре и цитоплазме одновременно.

Чаще всего вирус удаётся выделить из отделяемого канала шейки матки. Он редко определяется одновременно во всех образцах, полученных от больной, поэтому для уменьшения диагностических ошибок необходимо исследовать максимальное число образцов от одной пациентки.

Частота выделения антигена ВПГ – 2 у женщин в значительной мере зависит от фазы менструального цикла. Более чем у 70% пациенток, страдающих простым герпесом, он выделяется в начале лютеиновой фазы. В это же время отмечается усиление клинических проявлений ВПГ-инфекции у основного числа больных. Реже ВПГ выделяется в пред- и постменструальном периодах (у 12—30% больных). Частота выявления ВПГ у больных в остальные дни менструального цикла снижается до 5—8%. Значительный разброс в выявлении антигена ВПГ у женщин в различные дни менструального цикла показывает, что отрицательный результат однократного вирусологического исследования не может исключить полностью диагноз генитального герпеса. При подозрении на ВПГ- 2 инфекцию необходимо проводить повторное 1 раз в 7 дней, т.е. 2—4 раза в течение месяца вирусологическое исследование отделяемого мочеполовой системы у пациенток.

В специализированных вирусологических лабораториях вирус выделяют из инфицированного материала, полученного от больных, с помощью биологического метода, который состоит в изоляции ВПГ из клинического материала путем заражения культур клеток (выделение *in vitro*) или лабораторных животных, чувствительных к ВПГ (выделение *in vivo*). При выделении вируса в культуре клеток диагноз ставится через 24—48 часов и более на основании характерного цитопатического действия (ЦПД), которое оказывает ВПГ на клетки. Для выделения ВПГ *in vivo* можно использовать 12—13-дневные куриные эмбрионы и лабораторных животных (морских свинок, хомяков, крыс, собак, обезьян), у которых развиваются типичные для ВПГ- 2 инфекции симптомы.

Диагностическая ценность серологических методов при простом герпесе различна и зависит от формы инфекции (первичная, рецидивирующая), состояния реактивности организма больного, длительности заболевания и ряда других факторов.

В ответ на внедрение ВПГ в серонегативном организме начинается продукция специфических иммуноглобулинов класса М (IgM), которые определяются на 4— 6 день после инфицирования и достигают максимального значения на 15—20 сутки. С 10—14 дня начинается продукция специфических иммуноглобулинов G (IgG), несколько позднее – IgA. IgM и IgA сохраняются в организме человека недолго (1-2 месяца), IgG – в течение всей жизни (серопозитивность).

Диагностическое значение при первичной герпетической инфекции имеет выявление IgM и (или) четырехкратное увеличение титров специфических IgG в парных сыворотках крови, полученных от больной с интервалом 10—12 дней.

Рецидивирующий герпес обычно протекает на фоне высоких показателей IgG, свидетельствующих о постоянной антигенной стимуляции организма больной. Появление IgM у такой пациентки говорит об обострении болезни.

Для установления ВПГ-инфекции в диагностически сложных случаях необходимо комплексное вирусологическое обследование больных, включающее обнаружение антигена и анализ серологических показателей в динамике. Постановка диагноза герпетического цервицита только на основании серологического исследования может повлечь за собой диагностическую ошибку, так как низкие титры противогерпетических IgG не всегда доказывают отсутствие активной герпетической инфекции. Выявление же титров IgG выше средних является показанием к дополнительному обследованию пациентки с целью подтверждения или исключения диагноза ВПГ-инфекции (табл. 3).

Таблица 3
Методы идентификации ВПГ

Метод идентификации ВПГ

Чувствительность, %

Специфичность, %

Сроки постановки реакции

на культуре клеток и на животных по ЦПД

80 – 100

100

2 – 7 дней

по антигену:

РИФ (прямой и непрямой метод),

иммуноферментный метод (ИФА),

иммунопероксидазный метод

70 – 75

90

1 – 2 часа

по ДНК:

полимеразно-цепная реакция (ПЦР),

ДНК – гибридизация *in vitro* и *in situ*

95

90 – 100

1 – 2 дня

по морфологии инфицированных клеток:

в световом микроскопе

в электронном микроскопе

50 – 80

10 – 80

80
100
1 – 2 часа

по антителам –
специфическим IgG и IgM (метод ИФА)
90 – 95
90 – 95
4 – 6 час

1.5. *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*

Микоплазмы – самые мелкие прокариотические микроорганизмы, не имеющие клеточной стенки (это придает им сходство с L – формами бактерий) и способные к паразитированию на мембранах эукариотических клеток. Способность персистировать на мембранах клеток связана с наличием сходства структуры и состава цитоплазматической мембраны микоплазм с мембранами клеток эукариот и использованием микоплазмами их компонентов (прежде всего холестерина и фосфолипидов) для построения собственных структур. Микоплазмы имеют трехслойную цитоплазматическую мембрану, обеспечивающую целостность микробных клеток и частично замещающую в функциональном отношении отсутствующую клеточную стенку.

Основные характеристики микоплазм: отсутствие истинной клеточной стенки, мелкая кокковидная форма, паразитизм на мембранах эукариотических клеток, рост на плотных средах в виде мелких растущих в агар колоний с приподнятым центром (“яичница – глазунья”), абсолютная резистентность к пенициллинам и другим действующим на синтез клеточной стенки антибиотикам. Характеризуются малым размером генома, низким содержанием Г +Ц в ДНК. Имеют от 104 до 113 нуклеотидов в 5S рРНК.

M.hominis, *M.genitalium*, *M.fermentans* вызывают инфекции, при которых преобладают урогенитальные поражения.

В составе рода *Ureaplasma* штаммы, выделенные от людей, составляют вид *U.urealyticum*.

Морфология

Наиболее типичны мелкие кокковидные формы, выражен полиморфизм.

Культуральные и биохимические свойства

Микоплазмы и уреаплазмы прихотливы к условиям культивирования. В составе сред необходимы холестерин и стерин, нативные сыворотки, витамины, соли. Основным источником энергии являются углеводы (особенно глюкоза) или аминокислоты (аргинин). Для усиления восстановительных свойств сред добавляют L- цистеин. Оптимум температуры для культивирования от + 35 до +37С.

Оптимум рН для глюкозоферментирующих микоплазм (*M.genitalium*, *M.fermentans*, *M.pneumoniae*) – около 8,0. Эти микоплазмы ферментируют глюкозу до углекислого газа со сдвигом рН в кислую сторону и изменением цвета среды с зеленого на желто – лимонный.

Колонии уреаплазм (ранее называли Т- микоплазмами (от “tiny -маленький”) значительно меньше колоний классических микоплазм, на средах с добавлением сульфата марганца их колонии окрашиваются в золотисто – коричневый цвет, в отличии от микоплазм уреаплазмы мало чувствительны к небольшим дозам линкомицина (15 мкг/ мл).

Антигенная структура

Микоплазмы характеризуются выраженной гетерогенностью и изменчивостью антигенной структуры (антигенный полиморфизм). Известно 16 серотипов *U.urealyticum*, разделенных на серогруппы А и В. Степень гомологии серотипов существенно отличается. Часто выделяют

от больных смешанные культуры различных серотипов. Выделяют биофармы уреоплазм, отличающиеся по вирулентности и строению гена основного фермента – уреазы. Аналогичная динамичность и гетерогенность антигенной структуры и наличие различных сероваров характерна и для различных видов классических микоплазм. По биохимическим и в определенной мере антигенным свойствам среди микоплазм имеются виды – двойники (например, *M.pneumoniae* и *M.genitalium*). Среди антигенов выделяют белки – адгезины, фосфо – и гликолипиды, полисахаридные компоненты.

Факторы патогенности

1. Адгезины (обеспечивают взаимодействие с клетками хозяина).
2. Эндотоксины (не тождественны ЛПС грамотрицательных бактерий).
3. Гемолизины.
4. Ферменты – фосфолипаза А, аминопептидазы, протеазы, нейраминидаза.

Патогенез.

Микоплазмы – мембранные паразиты и способны адсорбироваться на различных эукариотических клетках. Этому способствует подвижность патогенных микоплазм, связанная с хемотаксисом и наличием микроворсинок. Микоплазмы способны тесно связываться с мембранами эукариотической клетки, вступать в межмембранное взаимодействие, обмениваться мембранными компонентами (в том числе использовать холестерин и стенолы для построения собственных клеток), оказывать разнообразное влияние на клетки. Коротко остановимся на основных эффектах действия микоплазм на различные клетки.

1. Взаимодействие с фагоцитирующими клетками вызывает цитопатический или цитотоксический эффект и гибель фагоцитов или приводит к длительной персистенции микоплазм в фагосомах фагоцитов.

2. Воздействие микоплазм на макрофаги приводит к нарушению их функций.

3. Персистенция микоплазм на мембранах лимфоидных клеток оказывает существенное влияние на их функции, в том числе непосредственное деструктивное воздействие на иммунокомпетентные клетки (*M.fermentans* оказывает СПИДо – подобное действие на иммунную систему).

4. Микоплазмы действуют на эритропоэз, т.е. на гомеостаз организма.

5. Обмен антигенными компонентами мембран с клетками хозяина обеспечивает антигенную мимикрию и развитие аутоиммунных реакций.

6. Отсутствие клеточной стенки и частая локализация микоплазм в инвагинатах мембран клеток объясняет их слабую иммуногенность и защиту от действия антител. Этому способствует также высокая антигенная изменчивость молликут.

7. Микоплазмы способны воздействовать на хромосомный аппарат клеток хозяина (на соматические и половые клетки), вызывая хромосомные абберации.

8. Ряд продуктов метаболизма оказывает токсическое воздействие на инфицированные клетки. Так, глюкозоферментирующие микоплазмы резко снижают рН и оказывают этим деструктивное действие на эпителиальные клетки.

Частота распространения отдельных видов микоплазм.

Среди семейства *Mycoplasmataceae* (*U. urealyticum*, *M. hominis*, *M. Genitalium*) на первом месте по частоте встречаемости стоят уреоплазмы, на втором – *M.hominis*, уступая только хламидиям. Большинство микоплазм – возбудители оппортунистических инфекций, наиболее часто их выявляют у категорий риска (больные с воспалительными процессами гениталий, часто меняющие сексуальных партнеров и др.), у беременных. Наибольший патогенный потенциал признают за *M.fermentans*, *U.urealyticum*.

Конец ознакомительного фрагмента.

Текст предоставлен ООО «ЛитРес».

Прочитайте эту книгу целиком, [купив полную легальную версию](#) на ЛитРес.

Безопасно оплатить книгу можно банковской картой Visa, MasterCard, Maestro, со счета мобильного телефона, с платежного терминала, в салоне МТС или Связной, через PayPal, WebMoney, Яндекс.Деньги, QIWI Кошелек, бонусными картами или другим удобным Вам способом.