



© З. М. Мартикайнен¹,
А. Н. Григорьев¹, О. С. Рыжкова¹,
Е. В. Шипицына¹, И. В. Литвиненко²,
А. В. Галкина², Н. И. Кудрявцева²,
Е. М. Тангатарова², О. А. Ломакина²,
Е. П. Протасова², С. Ю. Романцева²,
А. М. Савичева¹

¹ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта»

СЗО РАМН, Санкт-Петербург;

²СПб ГБУЗ «Городской кожно-
венерологический диспансер»,
Санкт-Петербург

СРАВНЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ *TRICHOMONAS VAGINALIS*

УДК: 616.9:576.893.161.21

■ В работе представлены данные по сравнению микроскопического, культурального и молекулярно-биологического (ПЦР) методов диагностики трихомониаза, а также проведена оценка качества питательных сред для культивирования трихомонад отечественных и зарубежных производителей. Показано, что самую высокую чувствительность имеет молекулярно-биологический метод (ПЦР в реальном времени). Достаточно чувствительным остается микроскопический метод исследования окрашенных и нативных препаратов. Питательные среды, широко используемые в нашей стране для выделения *Trichomonas vaginalis* из клинических материалов, нуждаются в оптимизации.

■ **Ключевые слова:** *Trichomonas vaginalis*; диагностика; ПЦР в реальном времени; микроскопическое исследование; питательные среды.

Введение

Трихомониаз относится к числу самых распространенных инфекций, передаваемых половым путем (ИППП). Согласно последним оценкам ВОЗ, в 2005 году в мире было зарегистрировано около 250 млн случаев трихомониаза, в том числе в странах Европы — 24,5 млн [9]. Это антропонозное заболевание вызывается облигатно-паразитическим жгутиковым простейшим *Trichomonas vaginalis*. В международной практике лабораторная диагностика трихомониаза основывается на микроскопическом исследовании нативного препарата и на культуральном исследовании — методах, суть которых заключается в выявлении живых трихомонад с характерной подвижностью [8]. В России диагностика трихомониаза осуществляется преимущественно методом микроскопического исследования окрашенных препаратов, и только в ограниченном числе учреждений используется микроскопическое исследование нативных препаратов и культуральное исследование [5]. Часто эффективность перечисленных методов невысока. Связано это с рядом факторов, таких как неправильная транспортировка клинического материала, ведущая к снижению подвижности и гибели трихомонад, неудовлетворительный состав питательных сред или недостаточный опыт исследователя, когда за трихомонады принимают другие клеточные элементы. Поэтому в последние годы широко внедряются более чувствительные молекулярно-биологические методы исследования, к которым относятся методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) и в первую очередь — полимеразная цепная реакция (ПЦР) [6, 7].

Целью данного исследования явилось сравнение микроскопического, культурального и молекулярно-биологического (ПЦР) методов диагностики трихомониаза, а также оценка качества питательных сред для культивирования трихомонад отечественных и зарубежных производителей.

Материалы и методы

Обследованы пациенты, обратившиеся в городской кожно-венерологический диспансер с жалобами и клиническими проявлениями, характерными для ИППП, и/или

имевшие контакт с больным трихомониазом, не принимавшие антибиотики в течение последних трех недель. Исследование проводилось в 2012–2013 годах.

Клиническими материалами для исследования служили: у женщин — отделяемое заднего и боковых сводов влагалища, у мужчин — выделения из уретры или клинический материал из передней уретры при воздержании от мочеиспускания не менее 2 часов.

Для микроскопического исследования полученный клинический материал наносили на три предметных стекла, окрашивали метиленовым синим и по Романовскому–Гимзе, а также готовили нативный препарат. Анализ проводили при увеличении светового микроскопа $\times 1000$ для окрашенных и $\times 400$ — для нативных препаратов.

Для культурального исследования использовали три питательные среды разных производителей: «Среда питательная для выделения трихомонад жидкая» производства ООО «НПФ Диагност-мед», Омск, Россия; «Питательная среда для визуального выявления *Trichomonas vaginalis* СВТ лиофилизированная» производства НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Россия; «Основа питательной среды для выделения трихомонад» производства HiMedia, Индия. Клинический материал вносили в пробирки с питательными средами сразу после взятия и доставляли в лабораторию в течение 2 часов, соблюдая температурный режим.

Пробы инкубировали в термостате 2–7 суток при 37 °C, после чего готовили препараты для нативной микроскопии и исследовали в проходящем свете при увеличении микроскопа $\times 400$. Учет результатов проводили на основании наличия или отсутствия подвижных форм трихомонад при просмотре 10–20 полей зрения.

Клинический материал для ПЦР-исследований помещали в транспортную среду (физиологический раствор). ДНК *Trichomonas vaginalis* выявляли методом ПЦР в реальном времени с использованием тестов производства ООО «НПО ДНК-Технология», Москва (Набор реагентов для выявления ДНК *Trichomonas vaginalis*: формат Rt) и ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва (АмплиСенс *N.gonorrhoeae/C.trachomatis/M.genitalium/T.vaginalis*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL).

Количественную оценку содержания ДНК *Trichomonas vaginalis* в клинических пробах осуществляли путем построения стандартных кривых с использованием коммерческого количественного стандарта *Trichomonas vaginalis* ATCC® 30001D (ATCC, Manassas, США).

Результаты и обсуждение

Всеми перечисленными методами исследованы пробы от 152 пациентов (90 женщин и 62 мужчины). Из них положительными (обнаружены *Trichomonas vaginalis*) оказались: при микроскопическом исследовании — 6 образцов (3,9%), при культуральном исследовании — 0 образцов (0%), при исследовании методом ПЦР — 7 образцов (4,6%).

Чувствительность и специфичность применяемых методов рассчитывали по формулам, приведенным в работе М. Domeika [4]. За истинно положительные принимали результаты, полученные при использовании тестов производства ООО «ДНК-технология», Москва [3]. Чувствительность микроскопического метода составила 85,7%, специфичность — 100%. При культуральном исследовании чувствительность метода составила 0%, специфичность — 99,3%. При исследовании клинических образцов с применением МАНК чувствительность и специфичность всех методов составила 100%. Положительные результаты при использовании разных методов сведены в таблицу 1.

Как видно из представленных данных, ни в одной из испытываемых питательных сред не удалось получить культуру *Trichomonas vaginalis*, даже при высокой концентрации возбудителя (пробы 120 и 126). После 7-суточного культивирования все питательные среды с внесенным клиническим материалом были проверены методом ПЦР на наличие в них ДНК возбудителя. Содержание ДНК *Trichomonas vaginalis* в этих питательных средах было 10^3 – 10^4 копий/мл. Отсутствие размножения трихомонад в питательных средах могло быть обусловлено неудовлетворительным составом сред, а также неоптимальными условиями культивирования, в частности недостаточной посевной дозой трихомонад.

Trichomonas vaginalis относят к облигатным паразитам, у которых потеряна способность синтезировать многие макромолекулы *de novo*, особенно пурины, пиримидины и многие липиды. Поэтому в культуральную среду для выделения этих простейших необходимо включать все важнейшие макромолекулы, витамины и минералы. Для роста трихомонад особенно важна сыворотка крови, поскольку она содержит липиды, жирные кислоты, аминокислоты и следы металлов [2]. Для подавления роста сопутствующей микрофлоры, продукты жизнедеятельности которой, вероятно, мешают размножению трихомонад, в питательную среду также следует добавлять антибактериальные препараты.

Результаты микроскопического и ПЦР-исследований совпали для 6 из 7 положительных проб. Лишь в одной пробе при количестве три-

Таблица 1

Сравнение микробиологических методов, применяемых для обнаружения *Trichomonas vaginalis*

№ пробы (пол)	Микроскопическое исследование		Культуральное исследование			ПЦР в реальном времени	
			НИИЭМ имени Пастера	Диагност- мед	HiMedia	ДНК-Технология (концентрация ДНК, копий/мл)	ЦНИИ эпидемиологии
	нативный препарат	окрашенный препарат					
7 (ж)	+	+	—	—	—	$+(1,7 \times 10^5)$	+
39 (ж)	+	+	—	—	—	$+(2,1 \times 10^5)$	+
48 (ж)	+	+	—	—	—	$+(2,3 \times 10^5)$	+
68 (ж)	—	—	—	—	—	$+(5,0 \times 10^3)$	+
85 (ж)	+	+	—	—	—	$+(1,4 \times 10^4)$	+
120 (ж)	+	+	—	—	—	$+(1,1 \times 10^7)$	+
126 (ж)	+	+	—	—	—	$+(5,7 \times 10^6)$	+

хомонад 5×10^3 копий/мл микроскопически обнаружить трихомонады не удалось. Бесспорным преимуществом использования тестов на основе МАНК является выявление малых количеств возбудителя.

Полученные нами данные о высокой чувствительности метода ПЦР для выявления *Trichomonas vaginalis* согласуются с данными недавнего исследования Гущина А. С. и соавт. [1], в котором была установлена высокая аналитическая чувствительность МАНК (14 клеток/мл). Однако в этом исследовании аналитическая чувствительность культурального метода (с использованием тех же питательных сред, что и в нашем исследовании) была достаточно высокой (10^4 клеток/мл) и превышала чувствительность микроскопического метода (10^5 клеток/мл). Данные различия могут быть объяснены тем, что в вышеупомянутом исследовании эксперименты по определению аналитической чувствительности проводились с использованием лабораторного штамма *Trichomonas vaginalis*, в то время как при анализе клинических проб чувствительность методов может быть ниже. Продемонстрированная в нашей работе относительно высокая чувствительность микроскопического исследования, сопоставимая с чувствительностью метода ПЦР, может быть объяснена тем, что клинические образцы были получены от пациентов КВД с симптомами урогенитальной инфекции. Известно, что при инфекциях, сопровождающихся клиническими проявлениями, как правило, возбудитель присутствует в более высоких концентрациях.

Таким образом, проведенное исследование по сравнению микробиологических методов для обнаружения *Trichomonas vaginalis* показало, что самой высокой чувствительностью обладает

молекулярно-биологический метод. При этом достаточно чувствительным остается микроскопический метод при исследовании как окрашенных, так и нативных препаратов. К сожалению, питательные среды, широко используемые в нашей стране для выделения трихомонад из клинических материалов, нуждаются в оптимизации. В их состав обязательно должны входить сыворотка крови и антибактериальные препараты. Требуется проведение дальнейших исследований по оценке и оптимизации питательных сред для выделения трихомонад.

Литература

1. Гущин А. Е., Рыжих П. Г. Сравнение пределов обнаружения микроскопии, культурального посева и методов амплификации нуклеиновых кислот, используемых в лабораторной практике для выявления *Trichomonas vaginalis*. Клиническая дерматология и венерология. 2012; 3: 16–21.
2. Копылов В. М., Бочкарев Е. Г., Говорун В. М. и др. Урогенитальный трихомониаз. Актуальные вопросы диагностики и лечения: пособие для врачей. 5-е изд. М.; 2005.
3. Шипицына Е. В., Золотоверхая Е. А., Григорьев А. Н. и др. Оценка методов амплификации нуклеиновых кислот для диагностики трихомониаза. Журнал акушерства и женских болезней. 2011; 3: 73–79.
4. Domeika M. Diagnosis of genital chlamydial infection in humans as well as in cattle. Uppsala; 1994.
5. Domeika M., Litvinenko I., Smirnova T. et al. Laboratory diagnostics for non-viral sexually transmitted infections in St. Petersburg, Russia: current situation and hallmarks for improvements. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2008; 22: 1094–1100.
6. Nye M. B., Schwebke J. R., Body B. A. Comparison of APTIMA *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification to wet mount microscopy, culture, and polymerase chain reaction for diagnosis of trichomoniasis in men and women. Am. J. Obstet. Gynecol. 2009; 200: 188.

7. Pillay A., Radebe F., Fehler G. et al. Comparison of a TaqMan-based real-time polymerase chain reaction with conventional tests for the detection of *Trichomonas vaginalis*. Sex. Transm. Infect. 2007; 83: 126–129.
8. Schwebke J., Burgess D. Trichomoniasis. Clin. Microbiol. Rev. 2004; 17 (4): 794–803.
9. World Health Organization. Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections, 2005 global estimates. Geneva: World Health Organization; 2011.

Статья представлена С. А. Сельковым,
ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН,
Санкт-Петербург

COMPARISON OF LABORATORY METHODS FOR DIAGNOSIS OF TRICHOMONAS VAGINALIS

Martikaynen Z. M., Grigoryev A. N., Ryzhkova O. S.,
Shipitsyna Ye. V., Litvinenko I. V., Galkina A. V.,
Kudryavtseva N. I., Tangatarova Ye. M., Lomakina O. A.,
Protasova Ye. P., Romantseva S. Yu., Savicheva A. M.

■ **Summary:** The paper presents data on comparison of microscopy, culture and molecular (PCR) methods for diagnosis of trichomoniasis, as well as on evaluation of the quality of culture media for isolation of trichomonads produced by Russian and international manufacturers. The highest sensitivity was shown for the molecular (real-time PCR) method. Microscopy of stained and wet smears demonstrated relatively high sensitivity. The culture media that are widely used in our country for *Trichomonas vaginalis* isolation need optimization.

■ **Key words:** *Trichomonas vaginalis*; diagnostics; real-time PCR; microscopy investigation; culture media.

Referens

1. Gushin A. E., Ryzhih P. G. Comparison of limits of detection of microscopy, cultural crops and methods of amplification of the nucleic acids used in laboratory practice for identification of *Trichomonas vaginalis*. Klinicheskaja dermatologija i venerologija. 2012; 3: 16–21. (in Russian).
2. Kopylov V. M., Bochkarev E. G., Govorun V. M. i dr. Urogenital trichomoniasis. Topical issues of diagnostics and treatment: grant for doctors. 5-e izd. M.; 2005. (in Russian).
3. Shipitsyna E. V., Zolotoverhaja E. A., Grigorjev A. N. i dr. Assessment of methods of amplification of nucleic acids for diagnostics of trichomoniasis. Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznej. 2011; 3: 73–79. (in Russian).
4. Domeika M. Diagnosis of genital chlamydial infection in humans as well as in cattle. Uppsala; 1994.
5. Domeika M., Litvinenko I., Smirnova T. et al. Laboratory diagnostics for non-viral sexually transmitted infections in St. Petersburg, Russia: current situation and hallmarks for improvements. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2008; 22: 1094–1100.
6. Nye M. B., Schwebke J. R., Body B. A. Comparison of APTIMA *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification to wet mount microscopy, culture, and polymerase chain reaction for diagnosis of trichomoniasis in men and women. Am. J. Obstet. Gynecol. 2009; 200: 188.
7. Pillay A., Radebe F., Fehler G. et al. Comparison of a TaqMan-based real-time polymerase chain reaction with conventional tests for the detection of *Trichomonas vaginalis*. Sex. Transm. Infect. 2007; 83: 126–129.
8. Schwebke J., Burgess D. Trichomoniasis. Clin. Microbiol. Rev. 2004; 17 (4): 794–803.
9. World Health Organization. Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections, 2005 global estimates. Geneva: World Health Organization; 2011.

■ Адреса авторов для переписки

Мартикайнен Зинаида Михайловна — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории микробиологии. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.

Григорьев Алексей Николаевич — научный сотрудник лаборатории микробиологии. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.

Рыжкова Ольга Сергеевна — научный сотрудник лаборатории микробиологии. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.

Шипицына Елена Васильевна — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории микробиологии. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.

Martikaynen Zinaida Mikhaylovna — PhD, Senior Researcher, Laboratory of Microbiology. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS. 199034, St. Petersburg, Mendeleyevskaya Line, 3, Russia.

Grigoryev Aleksey Nikolayevich — Researcher, Laboratory of Microbiology. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS. 199034, St. Petersburg, Mendeleyevskaya Line, 3, Russia.

Ryzhkova Olga Sergeyevna — Researcher, Laboratory of Microbiology. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS. 199034, St. Petersburg, Mendeleyevskaya Line, 3, Russia.

Shipitsyna Yelena Vasilyevna — PhD, Senior Researcher, Laboratory of Microbiology. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS. 199034, St. Petersburg, Mendeleyevskaya Line, 3, Russia.

Савичева Алевтина Михайловна — д. м. н., профессор, заведующая лабораторией микробиологии. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. **E-mail:** savicheva@mail.ru.

Литвиненко Ирина Викторовна — заведующая клинико-диагностической лабораторией. СПб ГБУЗ «Городской кожно-венерологический диспансер». 192102, Россия, Санкт-Петербург, наб. реки Волковки, д. 3. **E-mail:** gorkvd@bk.ru.

Галкина Алла Валентиновна — врач клинико-диагностической лаборатории. СПб ГБУЗ «Городской кожно-венерологический диспансер». 192102, Россия, Санкт-Петербург, наб. реки Волковки, д. 3. **E-mail:** gorkvd@bk.ru.

Кудрявцева Нина Игоревна — врач клинико-диагностической лаборатории. СПб ГБУЗ «Городской кожно-венерологический диспансер». 192102, Россия, Санкт-Петербург, наб. реки Волковки, д. 3. **E-mail:** gorkvd@bk.ru.

Тангатарова Елена Михайловна — заведующая диспансерным отделением. СПб ГБУЗ «Городской кожно-венерологический диспансер». 192102, Россия, Санкт-Петербург, наб. реки Волковки, д. 3. **E-mail:** gorkvd@bk.ru.

Ломакина Ольга Александровна — дерматовенеролог. СПб ГБУЗ «Городской кожно-венерологический диспансер». 192102, Россия, Санкт-Петербург, наб. реки Волковки, д. 3. **E-mail:** gorkvd@bk.ru.

Протасова Елена Петровна — дерматовенеролог. СПб ГБУЗ «Городской кожно-венерологический диспансер». 192102, Россия, Санкт-Петербург, наб. реки Волковки, д. 3. **E-mail:** gorkvd@bk.ru.

Романцева Светлана Юрьевна — дерматовенеролог. СПб ГБУЗ «Городской кожно-венерологический диспансер». 192102, Россия, Санкт-Петербург, наб. реки Волковки, д. 3. **E-mail:** gorkvd@bk.ru.

Savicheva Alevtina Mikhaylovna — MD, Professor, Head of the Laboratory of Microbiology. D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS. 199034, St. Petersburg, Mendeleyevskaya Line, 3, Russia. **E-mail:** savicheva@mail.ru.

Litvinenko Irina Viktorovna — Head of the Clinical Diagnostic Laboratory. City Dermato-venerological Dispensary. 192102, St. Petersburg, Volkovka Emb., 3, Russia. **E-mail:** gorkvd@bk.ru.

Galkina Alla Valentinovna — Bacteriologist of the Clinical Diagnostic Laboratory. City Dermato-venerological Dispensary. 192102, St. Petersburg, Volkovka Emb., 3, Russia. **E-mail:** gorkvd@bk.ru.

Kudryavtseva Nina Igorevna — Bacteriologist of the Clinical Diagnostic Laboratory. City Dermato-venerological Dispensary. 192102, St. Petersburg, Volkovka Emb., 3, Russia. **E-mail:** gorkvd@bk.ru.

Tangatarova Yelena Mikhaylovna — Head of the Outpatient Department. City Dermato-venerological Dispensary. 192102, St. Petersburg, Volkovka Emb., 3, Russia. **E-mail:** gorkvd@bk.ru.

Lomakina Olga Aleksandrovna — Dermatovenereologist. City Dermato-venerological Dispensary. 192102, St. Petersburg, Volkovka Emb., 3, Russia. **E-mail:** gorkvd@bk.ru.

Protasova Yelena Petrovna — Dermatovenereologist. City Dermato-venerological Dispensary. 192102, St. Petersburg, Volkovka Emb., 3, Russia. **E-mail:** gorkvd@bk.ru.

Romantseva Svetlana Yuryevna — Dermatovenereologist. City Dermato-venerological Dispensary. 192102, St. Petersburg, Volkovka Emb., 3, Russia. **E-mail:** gorkvd@bk.ru.