

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРИХОМОНИАЗА

*Мельник П.С., Рубаник Л.В., Полещук Н.Н.*  
Республиканский научно-практический центр  
эпидемиологии и микробиологии,  
Беларусь, Минск

*Проведено комплексное исследование 155 образцов биологического материала, полученных от лиц с воспалительными заболеваниями уrogenитального тракта. Для идентификации в образцах *Trichomonas vaginalis* параллельно использовали 4 метода: полимеразную цепную реакцию, выделение в культуре клеток, микроскопическое исследование и реакцию иммунофлюоресценции. Подтвержденно положительными считали только те образцы, в которых возбудитель был идентифицирован двумя методами. Проанализирована эффективность методов и причины разноречивых результатов при их применении.*

**Ключевые слова:** *урогенитальный трихомониаз; ПЦР; РИФ; культура клеток; цитологическое исследование*

## THE COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF UROGENITAL TRICHOMONIASIS LABORATORY DIAGNOSTICS METHODS

*Melni P.S., Rubanik L.V., Poleshchu N.N.*  
Republican scientific and practical center of  
epidemiology and microbiology,  
Belarus, Minsk

*A complex study of 155 biological samples obtained from persons with the urogenital tract inflammatory diseases, indicating the presence of urogenital trichomoniasis. Four methods in parallel were used for *Trichomonas vaginalis* identification in samples: polymerase chain reaction, isolation in cell culture, microscopic examination and immunofluorescence reaction. As confirmed positive were considered only those samples in which the pathogen was identified by two methods. The effectiveness of the methods and the reasons of conflicting results in their application were analyzed.*

**Key words:** *urogenital trichomoniasis; PCR; IF reaction; cell culture; cytological study*

Урогенитальный трихомониаз (УГТ) относится к числу заболеваний, передающимся преимущественно половым путем. Проблема диагностики и

лечения данной инфекции актуальна повсеместно и требует усилий и кооперации специалистов разного профиля (дерматовенерологов, гинекологов, урологов, врачей лабораторной диагностики и т.д.). Усовершенствование методов лабораторной диагностики и постоянный мониторинг заболеваемости задают тенденцию к ежегодному уменьшению количества регистрируемых случаев в Республике Беларусь. Так в 2018 году заболеваемость составляла 56,2 случаев на 100 000 населения. Тем не менее, в сопоставлении с заболеваемостью другими инфекциями, передаваемыми половым путем (сифилис – 4,76; гонококковая инфекция – 9,93; хламидиозом – 44,96 случаев на 100 000 населения) эпидемиологическую ситуацию по трихомониазу можно считать неблагоприятной [1]. Сохранение высокого значения данного показателя свидетельствует о необходимости усовершенствования профилактической работы, лабораторной диагностики и стратегии лечения.

К числу наиболее применяемых методов идентификации *Trichomonas vaginalis* как в мире, так и в Республике Беларусь относятся полимеразная цепная реакция (ПЦР), выделение в культуре клеток и жидкой питательной среде, микроскопическое исследование, реакция иммунофлюоресценции (РИФ). Каждый из перечисленных методов имеет свои преимущества и недостатки.

В последние годы появляется все больше сведений не только о морфологическом разнообразии патогена, но и о наличии различных геновариантов *T. vaginalis*, что обуславливает трудности его идентификации.

**Целью** данного исследования является сравнить методы лабораторной диагностики, используемые для идентификации *T. vaginalis*.

**Материалы и методы.** Материалом для лабораторного исследования служили образцы биологического материала (мазки-соскобы из урогенитального тракта (УГТ)): у женщин – отделяемое из цервикального канала, влагалища, уретры; у мужчин – отделяемое из уретры, секрет предстательной железы. Все обратившиеся в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии пациенты имели в анамнезе воспалительные заболевания мочеполового тракта и/или репродуктивные нарушения (бесплодие, выкидыши, замершие беременности).

Все полученные от 155 человек образцы подверглись параллельному лабораторному исследованию четырьмя методами: ПЦР, выделение в культуре клеток McCoу, цитологическое исследование, РИФ.

Для ПЦР-исследований клинический материал забирался в транспортную среду с муколитиком. Выделение ДНК из первичного материала осуществляли с помощью набора для выделения «Амплисенс РИБО-преп». Для детекции ДНК *T. vaginalis* использовали наборы для постановки ПЦР в режиме реального времени «Амплисенс *T. vaginalis*-FL». Все примененные наборы производства ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия.

При культуральном исследовании использовали 2-х суточную культуру клеток McCoу, выращенную на покровных стеклышках. Всю процедуру выделения трихомонад в культуре клеток McCoу проводили в соответствии со статьями Литвинчук Л. Ф. с соавт и G. E. Garber с соавт [2, 3]. После инокуляции образцов производили инкубацию в термостате при 37°С в течении 2 часов. На следующем этапе удаляли инокулят и вносили изолирующую среду с циклогексимидом и инкубировали при 37°С в течение 72 часов. Учет результатов осуществляли на световом микроскопе при увеличении ×1000, предварительно окрашивая препарат по Романовскому–Гимзе и/или обрабатывая специфическими противотрихомонадными антителами для выявления антигенов *T. vaginalis* в реакции иммунофлуоресценции (тест-система «ТрихоСкан» («ЛабДиагностика», Россия)).

Для микроскопического исследования клинический материал из различных участков урогенитального тракта наносили на предметные стекла, фиксировали и окрашивали красителем. Анализ проводили на световом микроскопе при увеличении ×1000.

Для выявления антигенов *T. vaginalis* в биологическом материале проводили РИФ с использованием тест-систем производства «ЛабДиагностика», Россия («ТрихоСкан»). Учет результатов происходил с помощью флуоресцентного микроскопа при увеличении ×1000. Постановку реакций и оценку результатов осуществляли согласно прилагаемой к набору инструкции.

**Результаты и обсуждение.** Среди обследованных лиц были представители обоих полов (84 мужчины и 71 женщина). Средний возраст лиц в выборке в независимости от пола составил 37±9 лет. Положительный результат на наличие в биологическом материале трихомонад был у 43 человек. Из них 55,8 % приходило на долю мужчин.

Количество идентифицированных положительных образцов отдельно по каждому из методов варьировало и представлено в таблице 1.

Таблица 1. Результаты комплексных исследований соскобного материала на наличие *T. vaginalis*

Результаты \ Метод	Метод			
	ПЦР	Выделение в культуре клеток	Микроскопическое исследование	РИФ
Положительный	4	70	43	32
Отрицательный	151	85	112	123

За подтвержденно положительные образцы принимались только те, которые сочетанием двух различных методов давали один и то же результат на наличие *T. vaginalis*. Сочетанием выделения в культуре клеток и цитологическим методом было получено большинство (41) истинно

положительных образцов. Еще 2 образца были подтверждены результатами методов РИФ и выделения в культуре клеток (табл. 2).

Таблица 2. Совпадение результатов исследований на *T.vaginalis* разными методами

Сочетание методов	Результаты	Положительный	Отрицательный
		4 метода	
ПЦР+КК+МИ+РИФ		4	83
		3 метода	
КК+МИ+РИФ		26	83
		2 метода:	
ПЦР+КК		4	85
ПЦР+РИФ		4	123
ПЦР+МИ		4	112
КК+РИФ		31	85
КК+МИ		41	83
РИФ+МИ		30	110

Прим.: КК – выделение в культуре клеток; МИ – микроскопическое исследование.

Выделением в культуре клеток трихомонады были обнаружены в наибольшем количестве образцов (70), включая все подтвержденные положительные. Стоит отметить, что преимущества выделения возбудителя в культуре клеток и жидких питательных средах заключаются в возможности искусственного накопления патогена в процессе культивирования *in vitro*, даже если в исходном материале его количество было предельно низким. Однако, при сопоставлении результатов, оказалось, что 38,6 % из них не были подтверждены другими методами. Данный факт объясняется сложностью визуальной идентификации возбудителя при микроскопическом исследовании. Также культуральный метод повышает вероятность выявления хронических форм инфекции, при которых может происходить морфологическая трансформация с образованием округлых, малоподвижных форм простейшего, что требует для идентификации высокой квалификации специалиста. В то же время он наиболее трудоемкий и дорогостоящий.

При проведении микроскопического исследования было получено 2 неподтвержденных положительных и 2 неподтвержденных отрицательных результата. Факторами, влияющими на достоверность этого метода могут быть: качество мазка, его толщина и возможность повреждения клеток патогена при окраске красителями. Тем не менее, микроскопический метод с окраской препарата позволяет за короткий промежуток времени (1 ч.) идентифицировать микроорганизм непосредственно в окрашенном мазке без предварительного накопления, что дает возможность не только визуализировать патоген, но и определить наличие/отсутствие воспалительной реакции, состояние

микробиоценоза конкретного биотопа (уретра, цервикальный канал, влагалище), цитологические маркеры возможных сопутствующих коинфекций.

РИФ является высокоспецифичной реакцией, за счет лежащего в ее основе взаимодействия антиген-антитело. При этом данный метод не требует наличия живых клеток трихомонад, достаточно лишь их антигенов. РИФ достаточно прост в учете и за счет высокоспецифического соединения не дал в нашем исследовании неподтвержденных положительных результатов. Однако количество неподтвержденных отрицательных результатов составило 11 (25,6 % от подтвержденных положительных). Причиной расценивания образцов как отрицательных можно считать малое количество клеток возбудителя в мазке, а также слизь, которая препятствует взаимодействию флуоресцентно-меченого иммуноглобулина с поверхностным антигеном *T. vaginalis*.

Наконец, ПЦР является наиболее распространенным и используемым методом диагностики, достоинствами которого являются стандартизированность, унифицированность и быстрота. Обращает на себя внимание, что показатель при использовании ПЦР-анализа был низким (4 положительных образца). Причинами могут служить несколько факторов: качество мазка, наличие ингибиторов реакции (кровь, слизь и тд.), небольшое количество клеток простейшего в забранном материале. В случае, если количество геномных эквивалентов патогена будет ниже порогового значения, идентификация методом ПЦР будет приводить к появлению отрицательных результатов. Кроме того, фундаментальной причиной невысокой выявляемости патогена с помощью ПЦР может быть генетическая вариабельность циркулирующих штаммов. В настоящее время, к наиболее высокоспецифичным локусам для детекции *T. vaginalis* относятся: гены  $\beta$ -тубулина, гены адгезии ar65, ген abr, ген ферредоксина, ген t9p и мультикопийные участки ДНК-повторов в геноме патогена (GenBank: L23861.1) [1]. Наличие мутаций в этих генах, используемых в качестве мишеней, приводит к снижению чувствительности ПЦР. Данный факт указывает на актуальность поиска других мишеней, разработки новых и усовершенствования имеющихся тест-систем.

Таким образом, эффективность идентификации трихомонад методами лабораторной диагностики с одной стороны предопределена – качеством исследуемого материала, с другой – наличием большого генетического и морфологического разнообразия возбудителя.

#### **Выводы:**

1. Оптимальным для идентификации *T. vaginalis* при острых и хронических формах инфекции является одновременное использование 2-3 методов (выделение в культуре клеток, микроскопическое исследование, РИФ).

2. Для повышения эффективности ПЦР-диагностики необходимо изучение всего генетического разнообразия штаммов, циркулирующих на территории Республики Беларусь.

### Список литературы

1. Рубаник, Л.В. Многолетняя динамика заболеваемости урогенитальным трихомониазом в Республике Беларусь и проблемы лабораторной диагностики / Л.В. Рубаник [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2019. – Т. 8, № 2. – С. 199-211.
2. Литвинчук, Л.Ф. Изучение биологических свойств и криоконсервации паразитического простейшего *Trichomonas vaginalis* при совместном культивировании с клеточными культурами / Л.Ф. Литвинчук [и др.] // Клеточные культуры. – 2011. – Т. 27. – С. 46-58.
3. Garber, G.E Cell culture compared with broth for detection of *Trichomonas vaginalis* / G.E. Garber [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1987. – Vol. 25, № 7. – P. 1275-1279.