

# **СРАВНЕНИЕ БАКТЕРИОСКОПИИ, КУЛЬТУРАЛЬНОГО МЕТОДА И ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГОНОРЕИ**

*Вознесенский Д.Л.<sup>1</sup>, Сехин С.В.<sup>1</sup>, Страчунский Л.С.<sup>1</sup>, Гуцин А.Е.<sup>2</sup>,  
Цеслюк М.В.<sup>2</sup>, Савочкина Ю.А.<sup>2</sup>, Шипулин Г.А.<sup>2</sup>*

*1 – НИИ антимикробной химиотерапии, Кафедра кожных и венерических  
болезней, Смоленская государственная медицинская академия (СГМА)  
Смоленск*

*2 – ГУ ЦНИИ эпидемиологии МЗ СР РФ (ЦНИИЭ), Центр молекулярной  
диагностики инфекционных болезней  
Москва*

## **Введение**

После значительного спада в конце прошлого века в последние несколько лет отмечается повсеместный рост заболеваемости гонококковой инфекцией. Учитывая то, что гонорея не имеет чётко выраженных спе-

цифических симптомов и наличие значительного числа бессимптомных и малосимптомных форм огромное значение имеет качественная лабораторная диагностика. В нашей стране на данный момент для диагностики гонореи традиционно применяются бактериоскопический и, реже, бактериологический (культуральный) методы, а современные методы диагностики, основанные на выявлении ДНК возбудителя, не включены в перечень обязательных диагностических тестов при обследовании на гонорею. Учитывая эпидемиологическую и клиническую ситуации, большое социальное значение этой инфекции, необходимо оптимизировать диагностический процесс при урогенитальной гонорее.

### **Цель**

Сравнить чувствительность и специфичность бактериоскопии, культурального метода и полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики гонореи.

### **Методы**

В течение 2002-2003 гг. было обследовано 203 пациента поликлиники Смоленского областного кожно-венерологического диспансера (СОКВД) (138 мужчин и 65 женщин). Забор материала для исследования производился стерильными тонкими тампонами из синтетической ваты (Sorap Inc., США). Для каждого метода исследования и различных анатомических локусов использовались отдельные тампоны. Очередность забора для каждого метода исследования менялась с каждым последующим пациентом. Бактериоскопическая диагностика производилась в лаборатории СОКВД на основании обнаружения в мазках из уретры и/или цервикального канала (ЦК) грамотрицательных (Гра(-)) внутри- и внеклеточных диплококков. Культуральная диагностика выполнялась на базе микробиологической лаборатории НИИАХ, посеvy производились непосредственно после забора клинического материала из уретры и/или цервикального канала штрихами на поверхность неселективного шоколадного гонококкового агара и помещались в атмосферу с повышенным содержанием CO<sub>2</sub> (банка с зажжённой свечой). Гонококковый агар готовился из гонококковой агаровой основы (GC agar base), сухого бычьего гемоглобина и 1% комплексной питательной добавки. Посевы помещались в термостат с повышенным (3%) содержанием CO<sub>2</sub> не позднее 5 часов после инокуляции. Оценка роста производилась через 18-24, 48 и 72 ч после посева. Предварительная идентификация гонококков проводилась на основании морфологии колоний, обнаружении грамотрицательных диплококков, положительного теста на содержание цитохромоксидазы, положительного супероксольного теста (с 30% перекисью водорода). Окончательная идентификация проводилась после выделения чистой культуры микроорганизмов по способности ферментировать только глюкозу, но не мальтозу, сахарозу или лактозу. Для ПЦР рабочая часть тампона срезалась ножницами в пластиковую пробирку с завинчивающейся

крышкой, содержащую 1 мл фосфатно-солевого буфера. Для выявления ДНК гонококков использовалась разработанная тест-система «Ампли-Сенс *Neisseria gonorrhoeae*» производства ЦНИИЭ. Данная тест-система предполагает две мишени для амплификации – фрагмент гена криптической плазмиды (сppB) и фрагмент гена хромосомной ДНК (M:Ngop11). Результаты ПЦР-анализа рассматриваются положительными в случае наличия продуктов амплификации обеих мишеней. Детекция продуктов амплификации проводилась как с использованием гель-электрофореза, так в режиме реального времени (ПЦР-РПВ) с использованием флуоресцентно-меченных (ФМ) зондов. Расчёт чувствительности и специфичности диагностических тестов производился по отношению к «золотому стандарту» – посеву на «шоколадный агар». Учитывая использование в данной работе двух независимых мишеней для амплификации, а также применение специфических ФМ-зондов – для оценки чувствительности и специфичности диагностических тестов был использован и т.н. «расширенный золотой стандарт» (положительные результаты двух тестов: культуральный метод + ПЦР). Чувствительность рассчитывалась как отношение числа пациентов с положительным результатом теста к числу всех инфицированных лиц (положительные «золотой» или «расширенный золотой» стандарты). Специфичность – отношение числа лиц с отрицательными результатами теста к числу всех неинфицированных пациентов (отрицательные «золотой» или «расширенный золотой» стандарты). Из анализа были исключены пациенты, принимавшими в течение 30 дней до визита препараты, обладающие противогонококковой активностью.

### Результаты

При помощи культурального метода было выявлено 85 случаев гонореи у мужчин. С использованием «расширенного золотого стандарта» гонорея была диагностирована у 88 пациентов. Только у одного пациента, выявленного при помощи культурального метода, отсутствовали симптомы уретрита. Помимо типичных гонококковых колоний на среде отмечался рост не более 1 – 2 морфотипов. Колонии гонококков хорошо визуализировались и окончательная их идентификация не представляла трудностей. У большинства пациентов (78 из 85) с культурально подтверждённым диагнозом гонококкового уретрита внутри- и внеклеточные Грам(-) диплококки были обнаружены при микроскопии (МС) материала из уретры, а у 7 (8,2%) пациентов – нет. В одном случае при обнаружении внутри- и внеклеточно расположенных Грам(-) диплококков отсутствовал рост на питательной среде. Таким образом, по отношению к культуральному методу (КМ) и «расширенному золотому стандарту» (РЗС) чувствительность бактериоскопического метода диагностики гонококкового уретрита у мужчин составила 91,7% и 89,7%, соответственно, а специфичность – 98,1% и 100%. Положительные результаты ПЦР были получены у 86 (62,3%) пациентов. У 3 (2,1%) из них результаты посева оказались отрица-

тельными. У всех пациентов с положительными результатами ПЦР были симптомы уретрита. Чувствительность ПЦР у мужчин по отношению к культуральному методу и «расширенному золотому стандарту» составила 97,6% и 97,7%, а специфичность – 94,3% и 100%, соответственно.

Результаты выявления гонококков различными методами у женщин (n=65) представлены в таблице.

	МС		КМ		ПЦР		РЗС	
	кол-во	%	кол-во	%	кол-во	%	кол-во	%
уретра	7	10,7	14	21,5	22	33,8	23	35,3
ЦК	7	10,7	15	23	28	43	30	46,1

У 4 из всех выявленных при помощи «расширенного золотого стандарта» симптомы цервицита и/или уретрита отсутствовали. На неселективной питательной среде из клинического материала, взятого у женщин, отмечался рост (иногда обильный) 3 – 4 морфотипов, что затрудняло выделение типичных гонококковых колоний и последующую их идентификацию. У 12 пациенток с положительными результатами культурального метода в материале из цервикального канала и уретры при микроскопии Грам(-) диплококки выявлены не были. У одной женщины при выявлении гонококков из цервикального канала отсутствовал рост из уретры. Чувствительность микроскопии материала из уретры и ЦК по отношению к культуральному методу составила 21,4% и 20%, соответственно; специфичность – 92%. По отношению к РЗС чувствительность МС при исследовании материала из уретры и ЦК составила 13% и 10%, соответственно, а специфичность – 90,4% и 88,6%. У двух женщин при положительном результате посева из ЦК и уретры методом ПЦР гонококки выявлены не были. В 15 (23%) и 9 (13,8%) случаях при положительных результатах ПЦР материала из ЦК и уретры, соответственно, при помощи культурального метода гонококки выявлены не были. У большинства пациенток с положительными результатами ПЦР присутствовали симптомы цервицита и уретрита (85,7% и 86,3%, соответственно). При тестировании материала из ЦК и уретры методом ПЦР чувствительность по отношению к РЗС составила 93,3% и 56,5%, а специфичность 100% и 78,6%, соответственно. По отношению к культуральному методу при исследовании материала из уретры и ЦК при помощи ПЦР чувствительность составила 92,8% и 86,6%, специфичность – 82,3% и 70%, соответственно. Культуральный метод диагностики гонококов по отношению к РЗС показал достаточно низкую чувствительность (≈50%) и высокую специфичность (98 - 100%).

Выводы: Полученные результаты свидетельствуют о том, что и бактериоскопия, и ПЦР-метод у мужчин обладают высокой чувствительностью (90% и 97%) и специфичностью (94 - 100%), что позволяет применять эти тесты для диагностики симптоматических гонорейных уретритов без

применения культурального метода.

У женщин бактериоскопия как метод диагностики гонококковых цервицитов и/или уретритов не может быть применена вследствие очень низкой чувствительности ( $\cong 10\%$ ). Его использование ведёт к большому количеству ложноотрицательных результатов и, как следствие, к неполной выявляемости гонореи среди женщин. Более низкая чувствительность культурального метода диагностики гонореи у женщин по сравнению с ПЦР возможно связана с проблемами, возникающими при идентификации типичных гонококковых колоний на неселективной питательной среде из клинического материала (небольшое количество возбудителя в инокуляте, выраженный рост сопутствующей микрофлоры). Вследствие этого представляется возможным использование ПЦР-метода у женщин в качестве скринингового, с последующим (при получении положительных результатов ПЦР) посевом клинического материала на селективную питательную среду.