

Современные направления и перспективы развития лабораторной диагностики инфекций, передаваемых половым путем

А.А. Кубанова, Н.В. Фриго, С.В. Ротанов, В.С. Соломка, К.И. Плахова, М.Р. Рахматулина, Т.Е. Манукьян

Modern approaches and prospects of development of laboratory diagnostics for sexually transmitted infections

A.A. KUBANOVA, N.V. FRIGO, S.V. ROTANOV, V.S. SOLOMKA, K.I. PLAKHOVA, M.R. RAKHMATULLINA, T.YE. MANUKIAN

об авторах:

А.А. Кубанова — академик РАМН, д.м.н., профессор, директор ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

Н.В. Фриго — д.м.н., главный научный сотрудник отделения лабораторной диагностики сифилиса отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

С.В. Ротанов — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник отделения лабораторной диагностики сифилиса отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

В.С. Соломка — к.б.н., старший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

К.И. Плахова — к.м.н., старший научный сотрудник отделения урогенитальных инфекций ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

М.Р. Рахматулина — д.м.н., ведущий научный сотрудник, и.о. заведующего отделом инфекций, передаваемых половым путем ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

Т.Е. Манукьян — аспирант ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

Представлены в сравнительном аспекте современные подходы к использованию известных лабораторных технологий диагностики сифилиса, гонореи, трихомониаза, урогенитальной хламидийной инфекции, принятые в мировой науке и практике.

Рассмотрены перспективные направления развития современных лабораторных технологий (биомикрочипы, мультипраймерная ПЦР, масс-спектрометрия, технология PLEX-ID, иммуноблоттинг, иммунохемилюминесценция, xMAP, пиросеквенирование), позволяющих идентифицировать возбудители инфекций, передаваемых половым путем, что необходимо для установления этиологического диагноза и определения рациональных методов терапии больных, и существенно сократить время обследования пациентов.

Ключевые слова: **диагностика инфекций, передаваемых половым путем, современные методы и технологии лабораторных исследований, сифилис, гонорея, трихомониаз, урогенитальный хламидиоз.**

The authors provide a comparison of modern approaches to the use of well-known laboratory methods for diagnostics of syphilis, gonorrhoea, trichomoniasis and urogenital chlamydiosis, which are approved in the world science and practice. They also examine promising directions in the development of up-to-date laboratory technologies (biomicrochips, multiprimer PCR, mass spectrometry, PLEX-ID technology, immunoblotting, chemiluminescence immunoassay (CLIA), xMAP, pyrosequencing) for detecting STD pathogens, which is necessary to make an etiological diagnosis and determine efficient methods of treatment minimizing the period of time required for examination of patients.

Key words: **diagnostics of sexually transmitted infections, modern approaches and laboratory methods, syphilis, gonorrhoea, trichomoniasis, urogenital chlamydiosis.**

■ Несмотря на наблюдаемую в последние десятилетия тенденцию к снижению заболеваемости инфекциями, передаваемыми половым путем (ИППП), ее уровень на территории Российской Федерации продолжает оставаться достаточно высоким, превышая аналогичные показатели в развитых странах Европы, большинстве стран постсоветского пространства и США. Анализ рангового распределения ИППП в целом по Российской Федерации, проведенный ФГУ «ГНЦДК» в 2010 г. (по готовящимся к публикации данным: Кубанова А.А. и соавт., 2011), выявил, что наиболее высокими являются показатели заболеваемости трихомониазом (126,8 на 100 000 населения), затем следуют уrogenитальный хламидиоз (71 на 100 000 населения), сифилис (44,9 на 100 000 населения), гонококковая инфекция (42,7 на 100 000 населения), аногенитальные бородавки (32,7 на 100 000 населения) и генитальный герпес (19,8 на 100 000 населения). Наблюдаются существенные различия в уровне заболеваемости ИППП в различных федеральных округах РФ, регистрируется очень высокий уровень заболеваемости в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах, отмечается высокий уровень заболеваемости среди подростков. Вышеизложенное свидетельствует об актуальности продолжения и дальнейшего совершенствования контроля над распространением ИППП на территории РФ.

Одним из ключевых факторов контроля над распространением ИППП является лабораторная диагностика. Данное обстоятельство определяется не только высоким уровнем заболеваемости ИППП, но также особенностями клинического течения ИППП, наблюдаемыми в настоящее время: многие ИППП (гонорея, уrogenитальный хламидиоз, трихомониаз) не имеют патогномоничных симптомов, в клинической картине ИППП в последние десятилетия преобладают вялотекущие, малосимптомные и бессимптомные формы заболеваний, нередко отмечается сочетанное поражение органов мочеполовой системы несколькими возбудителями, что затрудняет клиническую диагностику. Кроме того, биологические свойства возбудителей ИППП постоянно изменяются (мутации, развитие резистентности к антимикробным препаратам), что также может вызвать изменение клинического течения заболеваний. В связи с вышеизложенным установление точного этиологического диагноза ИППП и назначение адекватного лечения без лабораторного подтверждения в настоящее время не представляется возможным.

Основные направления развития лабораторной диагностики ИППП в условиях модернизации здравоохранения в Российской Федерации должны быть связаны с разумным и рациональным использованием известных диагностических технологий, а также с развитием и внедрением в практику новых медицинских технологий.

Современные тенденции в использовании известных диагностических технологий

Необходимым условием развития лабораторного обеспечения специализированной медицинской помощи является *стандартизация лабораторных исследований* в соответствии с современным уровнем научно-технического прогресса в области медицины.

Стандарт как комплекс требований, обеспечивающих необходимое клинике качество клинических лабораторных исследований, определяет тот обязательный уровень, ниже которого клинико-диагностические лаборатории не имеют права работать. При формировании стандартов лабораторного обеспечения медицинской помощи больным ИППП из перечня проводимых диагностических исследований должны быть исключены малоинформативные и не соответствующие современным требованиям методы и включены современные высокотехнологичные методы, обладающие высокой чувствительностью и специфичностью.

Абсолютный приоритет в диагностике ИППП в настоящее время во всем мире имеют прямые методы идентификации, связанные с выявлением возбудителя или его генетического материала. К числу наиболее известных прямых методов диагностики относятся: микроскопия, культуральное (бактериологическое) исследование, методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), в частности полимеразная цепная реакция (ПЦР). Эти методы являются основой окончательного диагноза инфекции.

Непрямые методы (направленные на определение антител к антигенам возбудителя заболевания) являются основой предполагаемого диагноза. Исключение составляет диагностика сифилиса, где определение антител к возбудителю имеет большое значение для установления диагноза.

Лабораторная диагностика сифилиса в настоящее время осуществляется с использованием прямых и непрямых методов. К числу прямых методов диагностики относятся: темнопольная микроскопия (ТПМ; dark field microscopy, DFM), метод прямой иммунофлюоресценции (ПИФ, direct immunofluorescent assay, DFA) и ПЦР (polymerase chain reaction, PCR).

Серологические (непрямые) методы продолжают играть важную роль при диагностике сифилиса ввиду того, что возбудитель сифилиса не культивируется на питательных средах *in vitro*, а также вследствие часто наблюдаемого скрытого течения инфекции и трудности получения биологического материала, пригодного для прямой идентификации *T. pallidum*. К числу непрямых методов диагностики сифилиса относятся нетрепонемные и трепонемные тесты.

Среди нетрепонемных тестов (в которых применяется антиген нетрепонемного происхождения) наиболее часто используют: РМП — реакцию микропреципитации с плазмой и инактивированной сывороткой, RPR — тест быстрых плазменных реагенов (Rapid

Plasma Reagins) или быстрый, или ускоренный плазмареагиновый тест; VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) — тест Исследовательской лаборатории венерических заболеваний [1].

Основными показаниями к применению нетрепонемных методов диагностики сифилиса являются: проведение скрининга населения на сифилис, диагностика сифилиса с определением активности инфекции и контроль эффективности специфической терапии путем определения титра антител.

Среди трепонемных тестов (в которых применяется антиген трепонемного происхождения) используют: ИФА — иммуноферментный анализ (EIA — Enzymelinked immunosorbent assay), ИХЛ — иммунохемилюминесцентное исследование (CLIA — chemiluminescence immunoassays), РПГА — реакцию пассивной гемагглютинации (ТРНА, ТРПА — *Treponema pallidum* hemagglutination assay, *Treponema pallidum* particle agglutination assay); РИФ — реакцию иммунофлюоресценции (FTA — Fluorescent treponemal antibody) [1]. Иммуноблоттинг — Immunoblotting (как правило, используется метод линейного иммуноблоттинга, являющийся вариантом иммуноферментного анализа) применяется в двух вариантах: для выявления IgG и IgM-антител к возбудителю сифилиса [2, 3]. РИБТ (РИТ) — реакция им-

мобилизации бледных трепонем (ТПИ — *Treponema pallidum* immobilization test) [4] в последние годы используется все реже и только в научных целях и в исследовательских лабораториях [42].

Основными показаниями к применению трепонемных методов диагностики сифилиса являются: проведение скрининга населения на сифилис (ИФА, РПГА, простые быстрые тесты), подтверждение положительных результатов нетрепонемных тестов.

Трепонемные тесты не могут быть использованы для контроля эффективности терапии, так как антитрепонемные антитела могут длительно циркулировать в организме больного, перенесшего сифилитическую инфекцию.

В табл. 1 суммированы основные положения последних рекомендаций по диагностике сифилиса, разработанных центрами по контролю над заболеваниями США (Centers for Disease Control and Prevention — CDC), Международным союзом по борьбе с инфекциями, передаваемыми половым путем, в Европе (International Union against Sexually Transmitted Infections — IUSTI), Государственным научным центром дерматовенерологии и косметологии (Россия) в рамках подготовки проектов стандартов оказания специализированной медицинской помощи больным сифилисом и международного сотрудниче-

ТАБЛИЦА 1

Рекомендации по диагностике сифилиса в странах Европы, США и России

Метод	Россия	Европа	США
ТПМ/DFM	+	+	+
ПИФ/DIF	–	+	–
ПЦР/PCR	– (исследовательский статус)	+ (с образцами, полученными из ротовой полости; при третичном, врожденном сифилисе)	+ (некоторые лаборатории)
РМП, RPR VDRL	+ (скрининг, контроль эффективности терапии)	+ (RPR, VDRL) (установление диагноза, контроль эффективности терапии)	+ (RPR, VDRL) (скрининг, установление диагноза, контроль эффективности терапии)
РПГА /ТРНА / ТРПА	+ (скрининг / подтверждение)	+ (скрининг / подтверждение; предпочтительный скрининговый тест)	+ (скрининг / подтверждение)
ИФА / ИХЛ (EIA / CLIA)	+ (скрининг / подтверждение)	+ ИФА / ИХЛ (ИФА — скрининг / подтверждение)	+ ИФА / ИХЛ (скрининг / подтверждение)
РИФ/FTA	+ скрытый сифилис (подтверждение)	+ не для скрининга (подтверждение)	+ не для скрининга (подтверждение)
РИБТ/ТПИ	+ скрытый сифилис (подтверждение)	–	–
IgG-иммуноблоттинг	–	+ (дополнительное подтверждение)	–

Примечание. Здесь и в табл. 1—4: + тест рекомендуется к применению; – тест не рекомендуется к применению.

ства с Восточно-Европейской сетью репродуктивного здоровья [1, 5—7].

Как следует из приведенных данных, все рекомендации по диагностике сифилиса включают прямой метод диагностики — темнопольную микроскопию. В Европейских рекомендациях [1] указывается также на возможность применения метода прямой иммунофлюоресценции при возможности использования соответствующих наборов реагентов.

Метод ПЦР также рекомендован к применению для диагностики сифилиса Европейским IUSTI, в особенности при локализации сифилитических высыпаний в полости рта или в других местах, подвергающихся контаминации трепонемами — комменсалами, а также при третичном и врожденном сифилисе. В США применение ПЦР рекомендовано лабораториям, располагающим соответствующими тест-системами (в том числе созданными в самих лабораториях (in house)). В России и странах Восточной Европы методу ПЦР пока придается исследовательский статус; широкое использование метода лимитируется небольшим количеством наборов реагентов, прошедших валидацию и разрешенных к медицинскому применению на территории соответствующих государств.

Из непрямых методов диагностики сифилиса все рекомендации включают применение:

- нетрепонемных тестов (РМП, RPR) для скрининга (Россия, США), установления диагноза (RPR, VDRL — Европа, США) и контроля эффективности терапии (все страны);
- РПГА и ИФА для скрининга на сифилис и подтверждения диагноза; в европейских странах и США с этой целью рекомендовано также применение метода иммунохемилюминесценции (ИХЛ);
- РИФ, но не в качестве скринингового и стандартного подтверждающего теста, а при необходимости дополнительного подтверждения в случае расхождения результатов скрининговых и подтверждающих трепонемных тестов. В российских проектах стандартов оказания специализированной медицинской помощи больным сифилисом РИФ реко-

мендована в качестве подтверждающего теста преимущественно при скрытом течении сифилитической инфекции.

РИБТ к настоящему времени исключена из стандартов диагностики сифилиса в странах Европы и США; в российских проектах стандартов оказания специализированной медицинской помощи больным сифилисом применение РИБТ рекомендовано только для подтверждения диагноза скрытого сифилиса.

Метод IgG иммуноблотинга в настоящее время включен в стандарты диагностики сифилиса в европейских странах (IUSTI) как дополнительный подтверждающий тест в случае несовпадения результатов скринингового и подтверждающего трепонемных тестов.

Лабораторная диагностика гонореи в настоящее время осуществляется с использованием прямых методов, к которым относятся микроскопия, бактериологическое (культуральное) исследование и ПЦР (табл. 2).

Все рекомендации по лабораторной диагностике гонококковой инфекции [5, 8—9] включают метод микроскопии мазков для применения в качестве диагностического теста только у мужчин с симптомами; в остальных случаях рекомендуется использование культурального исследования и методов амплификации нуклеиновых кислот, прежде всего ПЦР.

Культуральный метод, который до настоящего времени остается востребованным методом диагностики гонореи, рекомендован к применению во всех странах. Различия в рекомендациях, даваемых странами Европы и США в отношении использования культурального метода, касаются в основном спектра обследуемых очагов и образцов биологических материалов, потенциально содержащих возбудитель инфекции.

Методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) рекомендованы к применению для диагностики гонореи всеми странами; вместе с тем в Европейских рекомендациях указано на необходимость их подтверждения культуральным методом (Восточно-Европейская сеть репродуктивного здоровья, 2008) [13] или МАНК с другой молекулярной мишенью

ТАБЛИЦА 2

Рекомендации по диагностике гонореи в странах Европы, США и России

Метод исследования	Россия	Европа	США
Микроскопия*	+	+	+
Культуральное исследование**	+	+	+
ПЦР**	+	+	+

Примечание. * Рекомендуется только при обследовании мужчин с клиническими симптомами гонореи.

** Рекомендуется для скрининга с последующим подтверждением культуральным методом (Россия, Восточная Европа) или ПЦР с другими праймерами (другой мишенью для идентификации гонококка) (США, страны Европы).

(European IUSTI/WHO, 2009) [12]. В рекомендациях центров по контролю над заболеваниями (США) МАНК рекомендованы в качестве основного метода диагностики гонореи, за исключением исследования биологического материала, получаемого из глотки, прямой кишки и конъюнктивы глаз, для исследования которых с помощью МАНК пока не получено разрешения организации по управлению и контролю за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами США (FDA, Food and Drug Administration).

Непрямые методы диагностики, связанные с определением антител к возбудителю инфекции, к использованию в рутинной диагностике гонореи (а также и других ИППП: трихомониаза, урогенитального хламидиоза, микоплазменной инфекции, аногенитальных бородавок) в настоящее время не рекомендованы, так как определение антител не выявляет период «серологического окна», когда иммунный ответ на внедрение возбудителя еще не развился и может свидетельствовать о ранее перенесенной, а не активной инфекции. Кроме того, применяемые тест-системы нередко не обладают высокой чувствительностью и специфичностью, что не позволяет избежать ложноотрицательных и ложноположительных результатов.

Лабораторная диагностика трихомониаза в настоящее время осуществляется с использованием прямых методов, к которым относятся метод микроскопии (в том числе влажного мазка и окрашенно-

го препарата), метод культурального исследования и ПЦР (табл. 3).

Рекомендации по диагностике трихомониаза, даваемые разными странами (Европа, Россия, США) [1, 10, 11], практически идентичны и включают все перечисленные методы диагностики.

Предпочтение в диагностике трихомониаза отдается: методу влажного мазка, обладающему высокой специфичностью, высокочувствительному и специфичному методу культурального исследования, а также (особенно в последние годы) методу ПЦР, но при условии применения валидированных и разрешенных к медицинскому применению на территории отдельной страны тест-систем.

Метод микроскопии окрашенных препаратов в диагностике трихомониаза *приоритетным не является и не может применяться в качестве единственного метода диагностики*, так как обладает значительным субъективизмом при интерпретации результатов и может быть выполнен только опытным микроскопистом.

Приоритетным методом лабораторной диагностики **урогенитального хламидиоза (УГХ)** в настоящее время являются ПЦР и другие методы амплификации нуклеиновых кислот (табл. 4).

ПЦР и другие амплификационные методы (в том числе гнездная и мультиплексная ПЦР, методы амплификации, основанные на транскрипции, методы амплификации со смещением цепочки) являются

ТАБЛИЦА 3

Рекомендации по диагностике трихомониаза в странах Европы, США и России

Метод исследования	Россия	Европа	США
Микроскопия (влажный мазок)	+	+	+
Микроскопия (окрашенный препарат)	+	+	+
Культуральное исследование	+	+	+
ПЦР	+	+	+

ТАБЛИЦА 4

Рекомендации по диагностике УГХ в странах Европы, США и России

Метод исследования	Россия	Европа	США
ПЦР и другие МАНК	+	+	+
ПИФ	-	+	-
Выделение <i>C. trachomatis</i> в культуре клеток	+	+	-
ИФА на антиген	-	+	-
Серологические тесты на антитела	+	-	-

единственными рекомендуемыми методами диагностики УГХ в США [5].

В рекомендациях Европейского IUSTI [12] и Восточно-Европейской сети репродуктивного здоровья [13] также подчеркивается приоритет ПЦР. В рекомендациях IUSTI указывается также на необходимость детекции всех известных генотипов и вариантов *C. trachomatis*. Отмечается, что при позитивном результате МАНК необходимость подтверждения диагноза другими методами отсутствует. Указывается, что выбор технологической платформы амплификации нуклеиновых кислот для детекции *C. trachomatis* определяется стоимостью, длительностью проведения исследования, возможностью одновременного тестирования нескольких патогенов и автоматизации анализа.

При сохранении приоритета ПЦР Европейским IUSTI рекомендуется также применение других методов диагностики, в частности, метода прямой иммунофлюоресценции, выделения *C. trachomatis* в культуре клеток, ИФА для определения антигена *C. trachomatis* [12].

В российских рекомендациях (проект стандартов) из прямых методов исследования для диагностики УГХ, кроме ПЦР, рекомендовано также культуральное исследование; вместе с тем ввиду сложности и трудоемкости данного метода его применение может быть ограничено крупными лабораториями специализированных учреждений, осуществляющих диагностику данного заболевания (частота предоставления услуги — 0,5 ед. на 1 клинический случай).

Метод ПИФ в настоящее время исключен из российского проекта стандартов оказания специализированной медицинской помощи больным УГХ, так как данный метод недостаточно чувствителен для определения малых количеств элементарных тел *C. trachomatis*, требует исполнения опытным, компетентным лабораторным работником и существенно уступает в чувствительности и специфичности методу ПЦР.

Серологические методы детекции антител к *C. trachomatis* исключены из стандартов диагностики стран Европы и США как не имеющие высокой диагностической ценности, за исключением использования данного метода при диагностике венерической лимфогранулемы (высокие титры IgA и/или IgG-антител) и неонатальной пневмонии (определение IgM). В российских проектах стандартов оказания медицинской помощи больным УГХ определение антител к *C. trachomatis* пока сохранено с относительно невысокой частотой предоставления данной услуги (0,2 ед. на 1 клинический случай).

Развитие новых медицинских технологий

Несмотря на наличие богатого арсенала классических технологий, которые применяются для диагностики ИППП, ближайшее будущее диагностики связано,

несомненно, с развитием новых высокочувствительных и специфичных биомедицинских технологий, основанных на применении систем многопараметрического анализа, миниатюризации формата исследования и обеспечивающих ускорение цикла лабораторного обследования пациента.

Одной из передовых технологий современной лабораторной диагностики является **технология биомикрочипов**, позволяющая осуществлять исследование в миниатюрном (нано-) формате и в полном смысле слова создавать «лаборатории на чипе» (lab on a chip). Биомикрочип представляет собой твердофазный носитель, на котором расположены иммобилизованные зонды (одноцепочечные олигонуклеотиды) с уникальной последовательностью азотистых оснований. При наличии в биологическом материале ДНК искомого возбудителя происходит гибридизация зондов с ДНК микроорганизма, после чего в ячейках биомикрочипа производится детекция молекул, меченных флуоресцентной меткой; информация о наличии ДНК возбудителя в пробе регистрируется в автоматическом режиме.

Согласно данным маркетингового исследования (www.kaloramainformation.com), в США на рынке биомикрочипов отмечается ежегодный прирост (около 20%) ассортимента выпускаемых микрочипов [www.interlabservice.ru]. В России в настоящее время разработаны ДНК-чипы для выявления возбудителя туберкулеза и определения его чувствительности к противотуберкулезным препаратам, ДНК-чипы для идентификации возбудителей перинатальных инфекций: вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов (*HSV-1* и *HSV-2*), цитомегаловируса (*CMV*), а также *C. trachomatis*, *M. hominis* и *Ur. urealyticum*. [14, 15]. Разработаны анализаторы биочипов — аппаратно-программные комплексы, предназначенные для регистрации и последующей математической обработки люминесцентного изображения анализируемого биологического образца.

Сотрудниками ГНЦДК в рамках выполнения Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями (2007—2011 гг.)» в период 2007—2011 гг. разработаны и запатентованы ДНК-чипы для одновременной идентификации облигатных патогенов — возбудителей ИППП (*N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. pallidum*, *T. vaginalis*, *M. genitalium*, *Herpes virus I*, *Herpes virus II*) и ряда условно-патогенных микроорганизмов — возбудителей инфекционных заболеваний мочеполовой сферы [16—18]. Готовится документация для их регистрации в установленном порядке.

Наиболее важными практическими особенностями технологии ДНК-чипов являются возможность детекции микроорганизмов без их предварительного культивирования, а также возможность анализа большого набора ДНК различных микроорганизмов в одной пробе биологического материала, что важно при про-

ведении дифференциальной диагностики ИППП, сочетанных инфекциях, состояниях, сопровождающихся дисбалансом биотопа влажной, и т. д. Технология ДНК-чипов позволяет: осуществлять выявление некультивируемых и труднокультивируемых патогенов; проводить при ИППП идентификацию широкого спектра сопутствующей бактериальной флоры; существенно (более чем в 30 раз) сокращать (в сравнении с ПЦР) время комплексного обследования пациента на ИППП за счет проведения общей, а не отдельной для каждого микроорганизма реакции амплификации варибельного района гена 16S PНК общего для всех микроорганизмов.

Другой разновидностью биомикрочипов являются *белковые чипы*, или иммуночипы. Принцип их работы заключается во взаимодействии антигенов (или антител), иммобилизованных на поверхности биомикрочипа, с антителами (или антигенами), содержащимися в пробе биологического материала. Результат взаимодействия регистрируется на чип-ридере посредством детекции флуоресцентного сигнала, поступающего при образовании комплекса антиген — антитело [19—21].

В настоящее время запатентованы технологии белкового чипа для диагностики ревматоидного артрита, птичьего гриппа, атипичной пневмонии, туберкулеза, а также для идентификации возбудителей ряда инфекционных заболеваний (гепатиты В и С, ВИЧ, цитомегаловирус, герпес и др.) [22—27].

При выполнении задач Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями (2007—2011 гг.)» сотрудниками ГНЦДК в период 2007—2011 гг. был разработан и запатентован способ диагностики сифилиса с использованием биомикрочипа путем одновременного определения реагиновых и трепонемоспецифических антител к *T. pallidum* на микроскопных альдегидных слайдах [28]. Микроскопный альдегидный слайд — пластинка (стекло) размерами 25×72×1 мм с иммобилизованными на нем рекомбинантными антигенами *T. pallidum* и кардиолипидным антигеном — включает 12 областей для исследования 10 образцов и 2 контролей: отрицательного и положительного. Принцип исследования — непрямой метод выявления специфических антител к возбудителю сифилиса. Детекция — флуоресцентная — выявление специфических антител классов IgG и IgM к возбудителю с помощью антивидовых антител, модифицированных флуорофорами Су5 и Су3 соответственно. Использование разработанного высокопроизводительного способа диагностики позволяет значительно снизить время обследования пациентов при использовании минимального количества образца (10—50 мкл) и экономичном расходовании реагентов.

Проблема идентификации большого числа патогенов в клинической пробе в настоящее время решается

также с помощью **мультипраймерной ПЦР**, что дает возможность обнаруживать несколько инфекционных агентов в одной пробе биологического материала. В настоящее время в России и за рубежом разработаны наборы, позволяющие при проведении одной ПЦР выявлять одновременно до пяти возбудителей ИППП (*C. trachomatis*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *Ur. Urealyticum*, *Ur. T960*), наборы для выявления герпесвирусов (вируса простого герпеса, цитомегаловируса, вируса Эпштейна — Барр), папилломавирусов, лактобацилл и гарднерелл [15, 29—31].

Точную информацию о возбудителе способны дать и **методы протеомного анализа**. Самым бурно развивающимся направлением в этой области является анализ микроорганизмов с использованием матричной лазерной десорбционной ионизации в комплексе с времяпролетной масс-спектрометрией (Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionisation Time of Flight Mass-Spectrometry, MALDI-TOF MS). Метод позволяет проводить прямой масс-спектрометрический анализ белковой фракции микробной клетки (прямое белковое профилирование, протеомная индикация патогенов) без предварительного фракционирования и очистки отдельных белков и получать уникальные масс-спектры с высокой точностью и разрешением. Метод отличается простотой выполнения, высокой дискриминирующей способностью и производительностью, может быть использован в рутинной практике клинических лабораторий и в научных целях. В настоящее время данным методом возможно определение более 3000 бактерий и грибов [32—36].

Для многопараметрической идентификации патогенов, в частности возбудителей ИППП, перспективной является использование инновационной биосенсорной **технологии PLEX-ID**, производитель — компания Abbott Molecular (США) [37]. В технологии используется мультиплексная ПЦР в сочетании с высокоточной времяпролетной масс-спектрометрией нуклеиновых кислот. Идентификация инфекционных агентов производится автоматически на основании определения нуклеотидного состава ДНК микроорганизмов по уникальным массам электроспрейонизированных ПЦР-ампликонов, соответствующих конкретному классу и виду микроорганизмов. Использование технологии PLEX-ID позволяет определять бактерии, вирусы, грибы, определенные виды простейших, давать информацию о лекарственной устойчивости, вирулентности, токсикогенности микроорганизмов.

Молекулярные методы, традиционно применяемые для идентификации микроорганизмов и анализа нуклеотидных последовательностей ДНК: ПЦР, секвенирование (определение нуклеотидной последовательности молекулы ДНК) по методу Сенгера, не позволяют быстро анализировать большие массивы генетического материала, что можно осуществлять лишь с применением мощных технологий секвенирования и биоин-

формационного анализа полученных данных. Будущее микробиологической диагностики принадлежит технологии секвенирования нового поколения — **пирофосфатного секвенирования, или пиросеквенирования 454 Life Sciences** [38]. В отличие от других платформ секвенирования, технология пиросеквенирования является *высокопроизводительной* и дает возможность с высокой точностью (точность определения полной нуклеотидной последовательности ДНК составляет 99,9%) *быстро* получать последовательность *длинных фрагментов* ДНК/РНК (средняя длина анализируемых фрагментов составляет 400 нуклеотидов; длительность одного рабочего цикла при анализе более 100 000 фрагментов составляет всего 12 ч.). Система пирофосфатного секвенирования позволяет с беспрецедентной скоростью и производительностью осуществлять прочтение генетических текстов, проводить идентификацию вирусов, бактерий, грибов, а также выявить их мутации и резистентность к антимикробным препаратам. Данная платформа может с успехом применяться при проведении научных исследований, так как в настоящее время является признанным стандартом при *секвенировании de novo* (расшифровка абсолютно неизвестных последовательностей ДНК), частичном или полном ресеквенировании геномов, метагеномном анализе, исследованиях транскриптомов, полногеномном мутационном скрининге (SNP, перестройки), количественном анализе последовательностей.

В последние годы для диагностики инфекционных заболеваний и соматической патологии человека был разработан ряд новых методов иммуноанализа: это высокоточные биомедицинские технологии — метод иммуноблоттинга, иммунохемилюминесценция и xMAP-технология.

Принцип **метода иммуноблоттинга** заключается в помещении на нейлоновую мембрану с пластиковой основой нескольких дискретных антигенов возбудителя, полученных генно-инженерными способами, и дифференцированном выявлении к ним антител иммуноферментным методом. Применительно к диагностике ИППП за рубежом метод иммуноблоттинга получил наиболее широкое распространение при диагностике сифилиса [39, 40].

Метод обладает рядом преимуществ перед другими тестами, применяемыми для определения антител к возбудителю, высокой чувствительностью и специфичностью, превосходящей таковые общепринятых трепонемных тестов: FTA_{abs}, TPPA [41], отсутствием необходимости в опасных манипуляциях, связанных с перевивкой штаммов патогенной бледной трепонемы [42], возможностью применения теста для диагностики раннего врожденного сифилиса в варианте IgM-иммуноблоттинга [43, 44], а также для дифференциальной диагностики биологических ложноположительных реакций на сифилис, в особенности при аутоиммунных заболеваниях: ревматизме, системной красной

волчанке, когда классические трепонемные тесты (FTA_{abs}) дают ложноположительный результат [45].

В Российской Федерации планируется включение данного метода в стандарты диагностики сифилиса с целью его использования в качестве дополнительно подтверждающего теста.

Хемилюминесценция — процесс излучения фотонов при переходе электронно-возбужденных продуктов окислительных химических реакций в исходное энергетическое состояние. В таких реакциях выделяется значительное количество энергии и квантовый выход излучаемого света достаточно высок. Из всех неизотопных методов хемилюминесценция обеспечивает наиболее высокую чувствительность. Для иммунометрических методов чувствительность хемилюминесценции на порядки превосходит чувствительность радиоиммуноанализа. **Метод иммунохемилюминесценции** в настоящее время нашел применение при диагностике маркеров опухолей, аутоиммунных заболеваний, диабета, кардиомаркеров, гормонов (щитовидной железы, надпочечников, женских и мужских половых гормонов), TORCH-инфекций, вирусных гепатитов, вирусов группы герпеса.

На основе метода иммунохемилюминесценции разработан ряд высокочувствительных и специфичных (98—100%) тест-систем для диагностики сифилиса, применяемых в основном за рубежом [46, 47]. При наличии в лабораториях соответствующего оборудования и большом объеме (потоке) исследований метод иммунохемилюминесценции может быть применен в Российской Федерации в качестве скринингового и подтверждающего теста на сифилис.

xMAP-технология — современная технология, позволяющая проводить многопараметрические исследования путем одновременной детекции множества аналитов в одном биологическом образце. В качестве твердой фазы используются окрашенные микросферы, покрытые захватывающими реагентами (олигонуклеотидами, антителами, антигенами). Исследуемый образец добавляется к раствору, в котором содержатся микросферы. Выявляемые в образце аналиты связываются с соответствующей микросферой, после чего в раствор вносится детектирующий агент (детектирующие антитела, флуоресцентная метка). Для детекции определяемого аналита используется система двух лазеров, позволяющих проводить как *качественную* оценку наличия аналита в пробе (для этого используется красный лазер, классифицирующий микросферы по цвету), так и *количественную* оценку содержания аналита в пробе (для этого используется зеленый лазер). Исследование осуществляется в автоматическом режиме на анализаторах типа BioPlex200 (Bio-Rad), BioPlex2200 (Bio-Rad), Luminex100 (Luminex), снабженных программным обеспечением.

xMAP-технология, обладающая высокой аналитической чувствительностью, в настоящее время ис-

пользуется для решения широкого круга клинических задач; с ее помощью в одном образце биологического материала осуществляется одновременная детекция известных онкомаркеров, кардиомакеров, маркеров острой фазы и сахарного диабета, широкого спектра цитокинов, хемокинов, факторов роста. Одномоментная детекция множества аналитов в одном биологическом образце (многопараметрическая детекция) позволяет существенно снизить время обследования пациента [48, 49]. К настоящему времени разработаны ряд тест-систем для детекции антител к возбудителям ИППП, в частности сифилитической инфекции [50].

Таким образом, современная лабораторная база располагает обширным арсеналом общеизвестных

и инновационных технологий, которые могут быть с успехом использованы для диагностики ИППП. Автоматизация рутинных процедур, миниатюризация, объединение различных модулей в интегрированные многофункциональные системы — все это приводит к стремительному увеличению производительности биологических исследований и поднятию их на качественно новый уровень. Рациональное и целенаправленное использование этих технологий, а также материальных, кадровых, методологических ресурсов и подходов позволяет осуществлять эпидемиологический надзор и контроль над распространением ИППП на территории Российской Федерации. ■

Литература

- French P., Gomberg M., Janier M. et al. IUSTI: 2008 European Guidelines on the Management of Syphilis. *Int J STD & AIDS* 2009; 20: 300—309.
- Sambri V., Marangoni A., Eyer C. et al. Western Immunoblotting with Five Treponema pallidum Recombinant Antigens for Serologic Diagnosis of Syphilis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001 (May); 534—539.
- Hagedorn H.J., Kraminer-Hagedorn A., De Bosschere K. et al. Evaluation of INNO-LIA syphilis assay as a confirmatory test for syphilis. *J Clin Microbiol* 2002 (Mar); 40 (3): 973—978.
- Nelson R.A. Jr., Mayer M.M. Immobilization of Treponema pallidum in vitro by antibody produced in syphilitic infection. *J Exp Med* 1949; 89: 369—393.
- Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) 2010; 59 (RR-12): 1—114.
- Соколовский Е., Фриго Н., Ротанов С. и др. Руководство по лабораторной диагностике сифилиса в странах Восточной Европы. *Вестн. дерматол. и венерол.* 2008; 5: 87—96.
- Sokolovskiy E., Frigo N., Rotanov S. et al. Guidelines for laboratory diagnosis of syphilis in East-European countries. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23 (6, June): 623—632.
- Кубанова А.А., Фриго Н.В. и др. Протоколы лабораторной диагностики гонорейной инфекции. *Вестн. дерматол. и венерол.*, 2008; 1: 83—97.
- Bignell C. European (IUSTI/WHO) Guideline on the Diagnosis and Treatment of Gonorrhoeae in Adults International. *J STD & AIDS* 2009; 20: 453—457.
- United Kingdom National Guideline on the Management of Trichomonas vaginalis (2007). *Trichomoniasis_BASHH_2007.pdf*.
- Domeika M., Zhuraskaya L., Savicheva A. et al. Guidelines for the laboratory diagnosis of trichomoniasis in East European countries. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010; 24: 1125—1134.
- Lanjouw E., Ossewaarde J.M., Stary A. et al. European guideline for the management of Chlamydia trachomatis infections. (http://www.iusti.org/regions/europe/Euro_Guideline_Chlamydia_2010.pdf).
- Domeika M., Savicheva A., Sokolovskiy E. et al. Guidelines for the laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections in East European countries. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009 (Dec); 23 (12): 1353—1363.
- Мирзабеков А.Д., Прокопенко Д.М., Нечеткий В.Р. Применение матричных биочипов с иммобилизованной ДНК в биологии и в медицине в кн: Княжев В.А. (ред.) и Судаков К.В. (ред.) Информационные медико-биологические технологии. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002.
- Щербо С.Н., Тогузов Р.Т. Тенденции развития современной лабораторной медицины (лекция). *Клин. лаб. диагн.*, 2009; 3: 25—32.
- Заявка на патент № 2010113247/10(018628) «ДНК-чип для комплексной идентификации облигатно-патогенных возбудителей инфекций, передаваемых половым путем» (авторы Кубанова А.А., Кубанов А.А., Лесная И.Н., Фриго Н.В. и др.).
- Заявка на патент № 21010113246/10(018627) «ДНК-чип для комплексной идентификации условно-патогенных возбудителей урогенитальных инфекционных заболеваний» (авторы Кубанова А.А., Кубанов А.А., Лесная И.Н., Фриго Н.В. и др.).
- Заявка на патент № 2009140661 «Способ и ДНК-чип для комплексной диагностики инфекций, передаваемых половым путем» (авторы Кубанова А.А., Кубанов А.А., Лесная И.Н., Фриго Н.В. и др.).
- Tao S.C., Chen C.S., Zhu H. Applications of protein microarray technology. *Comb Chem High Throughput Screen* 2007 (Sep); 10 (8): 706—18.
- De Risi J., Penland L., Brown P.O. et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 1996; 14: 457.
- Schena M., Shalon D., Davis R.W. et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467.
- Чеканова Т.А., Маркелов М.Л., Манзюк И.Н. и др. Разработка иммуночипа для раздельной детекции антител к вирусу гепатита С. *Клин. лаб. диагн.*, 2008; 6: 25—30.
- Lebrun S.J. Microarray-Based Analysis of Rheumatoid Arthritis Markers. *US Pat.* 2008131417 (A1), 2008.
- Liancheng L. Method of Biochip for Simultaneous Testing Avian Influenza Infection of Human and Fowls. *Pat.* CN101000340 (A), 2007.
- Hu Zhangli. Human Sars Virus Surface Film Protein Antigen Determinant Polypeptide, Polynucleotide Sequence and Its Use. *Pat.* CN1580073 (A), 2005.
- Xiaogang Zhang. Mycobacterium tuberculosis recombination fusion protein and application thereof. *Pat.* CN101100673 (A), 2008.
- Zhang Tao. Protein chip for detecting infection disease in taken blood in blood bank. *Pat.* CN1373365 (A), 2002.
- Кубанова А.А., Кубанов А.А., Лесная И.Н. и др. Способ диагностики сифилиса путем одновременного определения реактивных и трепонемоспецифических антител к T.pallidum на микроскопных альдегидных стеклах. *Патент RU № 2 394 496 С1. Бюлл.* 2009 (20.07.10).

29. Suntoke T.R., Hardick A., Tobian A.A. et al. Evaluation of multiplex real-time PCR for detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, herpes simplex virus type 1 and 2 in the diagnosis of genital ulcer disease in the Rakai District, Uganda. *Sex Transm Infect* 2009 (Apr); 85 (2): 97—101.
30. McKechnie M.L., Hillman R., Couldwell D. et al. Simultaneous identification of 14 genital microorganisms in urine by use of a multiplex PCR-based reverse line blot assay. *J Clin Microbiol* 2009 (Jun); 47 (6): 1871—1877.
31. Wang H., Kong F., Wang B. et al. Multiplex polymerase chain reaction-based reverse line blot hybridization assay to detect common genital pathogens. *Int J STD AIDS* 2010 (May); 21 (5): 320—325.
32. Behrendt U., Schumann P., et al. *Agrococcus versicolor* sp. nov., an actinobacterium associated with the phyllosphere of potato plants. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008; 58(Pt 12): 2833—2838.
33. Hsieh S.Y., Tseng C.L. et al. Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7(2): 448—456.
34. Nagy E., Maier T. et al. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15 (8): 796—802.
35. Seng P., Drancourt M. et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* (2009); 49 (4): 543—551.
36. Alispahic M., Hummel K., et al. Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry analysis. *J Med Microbiol* 2010; 59 (Pt 3): 295—301.
37. Abbott Molecular (http://www.rusnanonet.ru/equipment/plex_id).
38. Пиросеквенирование (аналитический обзор). (<http://molbiol.ru/bio/001/001.html>).
39. Welch RJ, Litwin CM. Evaluation of two immunoblot assays and a Western blot assay for the detection of antisiphilic immunoglobulin G antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 2010 (Jan); 17(1): 183—184.
40. Lam TK, Lau HY, Lee YP et al. Comparative evaluation of the INNO-LIA syphilis score and the MarDx *Treponema pallidum* immunoglobulin G Marblot test assays for the serological diagnosis of syphilis. *Int J STD AIDS*. 2010 (Feb); 21(2): 110—113.
41. Marangoni A, Sambri V, Olmo A et al. IgG western blot as a confirmatory test in early syphilis. *Zentralbl Bacteriol* 1999 (Apr); 289 (2): 125—133.
42. Paris-Hamelin A, Debryne M, Fustec-Isarboure S. Immunoblotting for the serodiagnosis syphilis. A candidate to replace the Nelson-Mayer test. *Ann Pharm Fr* 1999 (Jan); 57 (1): 67—75.
43. Sanchez PJ, McCracken GHJr, Wendel GD et al. Molecular analysis of the fetal IgM response to *Treponema pallidum* antigens: implications for improved serodiagnosis of congenital syphilis. *J Infect Dis* 1989 (Mar); 159 (3): 508—517.
44. Lewis L, Taber LN, Baughn RE. Evaluation of immunoglobulin M western blot analysis of congenital syphilis. *J Clin Microbiol* 1990 (Feb); 28 (2): 296—302.
45. Murphy FT, George R, Kubota K et al. The use of Western blotting as the confirmatory test for syphilis in patients with rheumatic disease. *J Rheumatol* 1999 (Nov); 26 (11): 2448—2453.
46. Marangoni A, Sambri V, Accardo S et al. Evaluation of LIAISON *Treponema* Screen, a novel recombinant antigen-based chemiluminescence immunoassay for laboratory diagnosis of syphilis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005, 12 (10): 1231—1234.
47. Young H, Pryde J, Duncan L et al. The Architect Syphilis assay for antibodies to *Treponema pallidum*: an automated screening assay with high sensitivity in primary syphilis. *Sex Transm Infect* 2009; 85: 19—23.
48. Binnicker MJ, Jespersen DJ, Harring JA et al. Evaluation of a multiplex flow immunoassay for detection of epstein-barr virus-specific antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 2008 (Sep); 15 (9): 1410—1413.
49. Binnicker MJ, Jespersen DJ, Harring JA. Multiplex Detection of IgM and IgG Class Antibodies to *Toxoplasma gondii*, Rubella Virus, and Cytomegalovirus Using a Novel Multiplex Flow Immunoassay. *Clin Vaccine Immunol* 2010 (Nov); 17 (11): 1734—1738.
50. Gomez E, Jespersen DJ, Harring JA et al. Evaluation of the Bio-Rad BioPlex 2200 Syphilis Multiplex Flow Immunoassay for the Detection of IgM- and IgG-Class Antitreponemal Antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 2010 (Jun); 17 (6): 966—968.