



ПЦР диагностика ИППП

Старший преподаватель кафедры лабораторной диагностики ИПО БГМУ, к.м.н.

Билалов Фаниль Салимович

ИППП

- В настоящее время комплекс инфекций передающихся половым путём (ИППП) включает в себя более 20 заболеваний, вызываемых **бактериями, вирусами, простейшими, грибами.**

Путь передачи

- Объединяющим признаком для данной группы заболеваний является заражение в основном во время полового контакта.
- Инфицирование происходит при контакте зараженных жидкостей организма больного (например, спермы и влагалищных выделений) со слизистой оболочкой партнера (**контактный половой путь**).
- Инфекция может также передаваться от инфицированной матери плоду и новорожденному (**вертикальный путь**).
- Инфицирование бытовым путём через полотенца, туалетные принадлежности, и т.п. крайне редко возможно для некоторых заболеваний (**контактный бытовой путь**).

ИППП Этиология

- **бактериальные инфекции:** паховая гранулёма (донованоз), мягкий шанкр, сифилис, венерическая лимфогранулёма, хламидиоз, гонорея, микоплазмоз, уреаплазмоз;
- **вирусные инфекции:** ВИЧ, генитальный герпес, остроконечные кондиломы, вызываемые папилломавирусом человека, гепатит В, цитомегаловирус (герпесвирус человека тип 5), контагиозный моллюск, Саркома Капоши (герпес тип 8);
- **протозойные инфекции:** трихомониаз;
- **грибковая инфекция:** кандидоз (молочница);
- **паразитарные заболевания:** фтириаз, чесотка;

- **Паховая гранулёма** (лат. *granuloma inguinale*) — инфекционное заболевание, вызываемое бактериями вида *Calymmatobacterium granulomatis*.

- **Мягкий шанкр** (лат. *Ulcus Molle*) — инфекционное заболевание, передающееся половым путём. Возбудителем болезни является бактерия Haemophilus ducreyi. Заболевание распространено главным образом в Африке, Центральной и Южной Америке. В России встречается крайне редко.

- **Сифилис** (устар.: люэс) — хроническое системное венерическое инфекционное заболевание с поражением кожи, слизистых оболочек, внутренних органов, костей, нервной системы с последовательной сменой стадий болезни, вызываемое бактериями вида *Treponema pallidum* (бледная трепонема) подвида *pallidum*, относящимся к роду трепонема (*Treponema*) (От др.-греч. τρέπτω — поворачиваю, νῆμα — нить) семейства Spirochaetaceae (От др.-греч. σπείρα — завиток, χαίτη — длинные волосы)^[2].

- **Венерическая лимфогранулёма** (болезнь Дюрана-Николя-Фавра) — хроническое заболевание, передающееся половым путём. Возбудителем являются инвазивные серовары L1, L2 и L3 *Chlamydia trachomatis*. Характеризуется специфическим поражением паховых, бедренных, подвздошных и глубоких тазовых лимфатических узлов.

- **Хламидиоз** — инфекционное заболевание, передающееся половым путём, вызываемое хламидиями (*Chlamydia trachomatis*). Является одним из самых распространённых инфекционных заболеваний, передающихся половым путём. По статистике ежегодно хламидиозом в мире заболевает 100 млн человек, а число инфицированных хламидиями людей на всем земном шаре по самым скромным подсчётам достигает одного миллиарда. По данным ВОЗ и многочисленных отечественных и зарубежных исследователей, урогенитальный хламидиоз является одним из самых распространённых заболеваний, передаваемых половым путём, поэтому серьёзную проблему для современной венерологии представляет поиск максимально эффективных средств лечения так называемых негонококковых воспалительных заболеваний органов мочеполовой системы.

- **Гонорéя** (от др.-греч. γόνος «семенная жидкость» и ῥέω «теку») — инфекционное заболевание, вызываемое грамотрицательным диплококком — гонококком лат. *Neisseria gonorrhoeae*, передаваемая половым путём и характеризующаяся поражением слизистых оболочек мочеполовых органов. Относится к венерическим заболеваниям. При гонорее поражаются слизистые оболочки чаще всего половых путей, но могут поражаться слизистая прямой кишки, конъюнктивы (в таком случае болезнь называется бленнорейя).

- **Уреаплазмоз** — заболевание, вызываемое специфическим микроорганизмом Ureaplasma urealyticum (уреаплазма уреалитикум), относящимся к Грам-негативным микробам, лишенным клеточной стенки. В организм человека инфекция может попасть при рождении от больной матери: микробы могут попадать в половые пути ребёнка во время родов и сохраняться там всю жизнь, находясь в неактивном состоянии. Так, при обследовании детей колонизация влагалища уреаплазмами выявляется у 5%.

● **Вирус простого герпеса второго типа** (англ. *Herpes simplex virus 2, HSV-2, Human herpesvirus 2*) — вид семейства вирусов герпеса *Herpesviridae*, вызывающие у человека инфекции гениталий (генитальный герпес)^[3]. Этот вирус является нейротрофным и нейроинвазивным, то есть после заражения мигрирует в нервную систему. Вирус особенно опасен для людей с ослабленной иммунной системой, например для ВИЧ-инфицированных, а также для тех, кто недавно перенёс операцию по трансплантации органов, так как медикаменты, используемые при трансплантации, подавляют иммунную систему^[4].

- **Папилломавирус человека (HPV — *Human Papillomavirus*)** — вирус из рода папилломавирусов, семейства паповавирусов.
Передаётся только от человека к человеку и приводит к изменению характера роста тканей. Известно более 100 видов ВПЧ. Из них более 40 — могут вызвать поражение аногенитального тракта (половые органы и анальное отверстие) мужчин и женщин и появление остроконечных кондилом.
Некоторые из них безвредны, другие вызывают бородавки, некоторые вызывают рак.

- **Гепатит В** — вирусное заболевание, возбудителем которого является вирус гепатита В (в специальной литературе его могут обозначать «вирус ГВ», ВГВ или HBV) из семейства гепаднавирусов. Вирус отличается чрезвычайно высокой устойчивостью к различным физическим и химическим факторам: низким и высоким температурам (в том числе кипячению), многократному замораживанию и оттаиванию, длительному воздействию кислой среды. Во внешней среде при комнатной температуре вирус гепатита В может сохраняться до нескольких недель: даже в засохшем и незаметном пятне крови, на лезвии бритвы, конце иглы. В сыворотке крови при температуре $+30^{\circ}\text{C}$ инфекционность вируса сохраняется в течение 6 месяцев, при -20°C около 15 лет. Инактивируется при автоклавировании в течение 30 минут, стерилизации сухим жаром при температуре 160°C в течение 60 минут, прогревании при 60°C в течение 10 часов.

- **Трихомони́аз** занимает первое место по распространённости среди заболеваний мочеполового тракта. Кроме того, трихомониаз держит первенство и среди заболеваний, передаваемых половым путём. По данным Всемирной организации здравоохранения (1999 г.), 10% населения земного шара болеют трихомониазом. Трихомониаз ежегодно регистрируют у около 170 млн человек. Возбудитель — влагалищная трихомонада (*Trichomonas vaginalis*).
- Трихомониаз опасен в первую очередь тяжёлыми последствиями в виде осложнений, которые могут быть причиной бесплодия, патологии беременности и тому подобного. Основное место обитания трихомониаза в мужском организме — уретра, предстательная железа и семенные пузырьки, в женском — ваги́нище. Однако при первом попадании в организм трихомонады всегда вызывают уретрит. Заражение происходит половым путём при контакте с больным или носителем инфекции. Инкубационный период составляет 1-4 нед.

- **Фтириаз** (лобковый педикулез; лат. *Pediculosis pubis, Phthiriasis*) — энтомоз, паразитарное венерическое заболевание кожи вызываемое лобковой вошью.

- **Чесотка** (лат. *scabies*) — заразное кожное заболевание, акариаз из группы акародерматитов, вызываемое микроскопическим паразитом — чесоточным клещом или чесоточным зуднем (лат. *Sarcoptes scabiei var. hominis*). Название возбудителя происходит от др.-греч. σάρξ (мясо, мякоть), κόπτειν (грызть, терзать, резать) и лат. *scabere* (расчесывать). Характерными признаками заболевания являются зуд и папуловезикулезная сыпь, часто с присоединением вторичных гнойничковых элементов вследствие инфицирования при расчесывании. Само слово «чесотка» является однокоренным с глаголом «чесаться»^[6].

Лабораторная диагностика

1. микроскопия мазка (прямая и люминесцентная)
2. культуральный метод (нанесение образца на питательную поверхность, затем анализ лекарственной устойчивости)
3. выявление антигенов к возбудителю (методами ИФА — иммуно-ферментного анализа и ПИФ — прямой иммунофлюоресценцией)
4. выявление ДНК возбудителя (методом ПЦР — полимеразной цепной реакции)
5. выявление антител в крови (иммунного ответа организма на возбудителя)

Правила взятия мазка. Мужчины

- Перед забором соскоба из уретры необходимо обработать головку полового члена и области наружного отверстия уретры тампоном, смоченным стерильным физраствором. Проводят массаж уретры. При наличии свободно стекающих из уретры выделений удаляют их сухим тампоном. Вводят зонд в уретру на глубину 3-4 см. несколькими вращательными движениями производят соскоб и готовят мазок-отпечаток, касаясь всеми поверхностями зонда поверхностями предметного стекла. Приготовленный мазок высушивают на воздухе в течение 10 минут. Готовый препарат поместить в индивидуальную упаковку (полиэтиленовый пакет), прикрепить направление степлером и отправить в лабораторию.

Правила взятия мазка. Женщины

- **Цервикальный канал:** удаляют слизь с поверхности шейки матки тампоном, вводят зонд в цервикальный канал на 1-1,5 см и вращают его в течение 3-5 секунд. Извлекают зонд, избегая касания стенок влагалища, и делают мазок-отпечаток.

Правила взятия мазка. Женщины

- **Уретра:** перед забором соскоба из уретры необходимо обработать ее наружное отверстие тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором. Производят массаж уретры пальцем со стороны влагалища, прижимая ее к лобковой кости. Вводят зонд в уретру на глубину 1-1,5 см и аккуратно, не поранив слизистую, несколькими вращательными движениями производят соскоб и готовят мазок-отпечаток, касаясь всеми поверхностями зонда поверхности предметного стекла. Приготовленный мазок высушивают на воздухе 10 минут.

Правила взятия мазка. Женщины

- **Задний свод влагалища.** В случае избытка слизи и обильных выделений удаляют их стерильным ватным тампоном. Проводят зондом по поверхности слизистой в области заднего свода влагалища и экзоцервикса и готовят мазок-отпечаток, касаясь всеми поверхностями зонда поверхности предметного стекла. Приготовленный мазок высушивают на воздухе 10 минут.

Секрет предстательной железы для микроскопического исследования.

- После окончания массажа предстательной железы секрет в количестве 0,5-1,0 мл собирают в одноразовую стерильную пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл. При невозможности получить секрет - сразу после массажа собирают первую порцию мочи (в которой содержится секрет предстательной железы) в количестве не менее 10 мл в специальный стерильный сухой флакон.



Микроскопия мазка (прямая и люминесцентная)

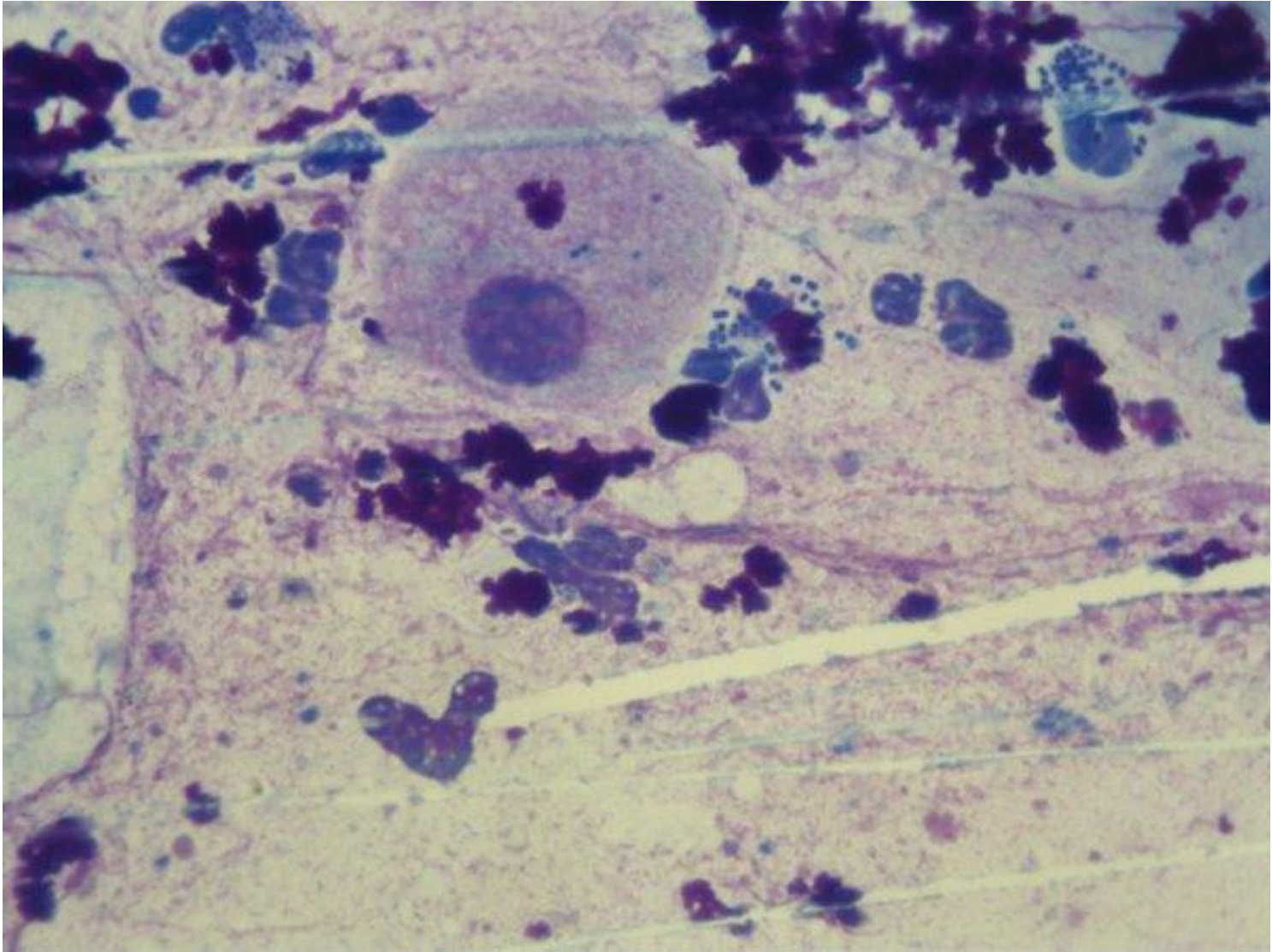
Преимущества

1. Быстрота
2. Дешевизна
3. Не требует особой подготовки

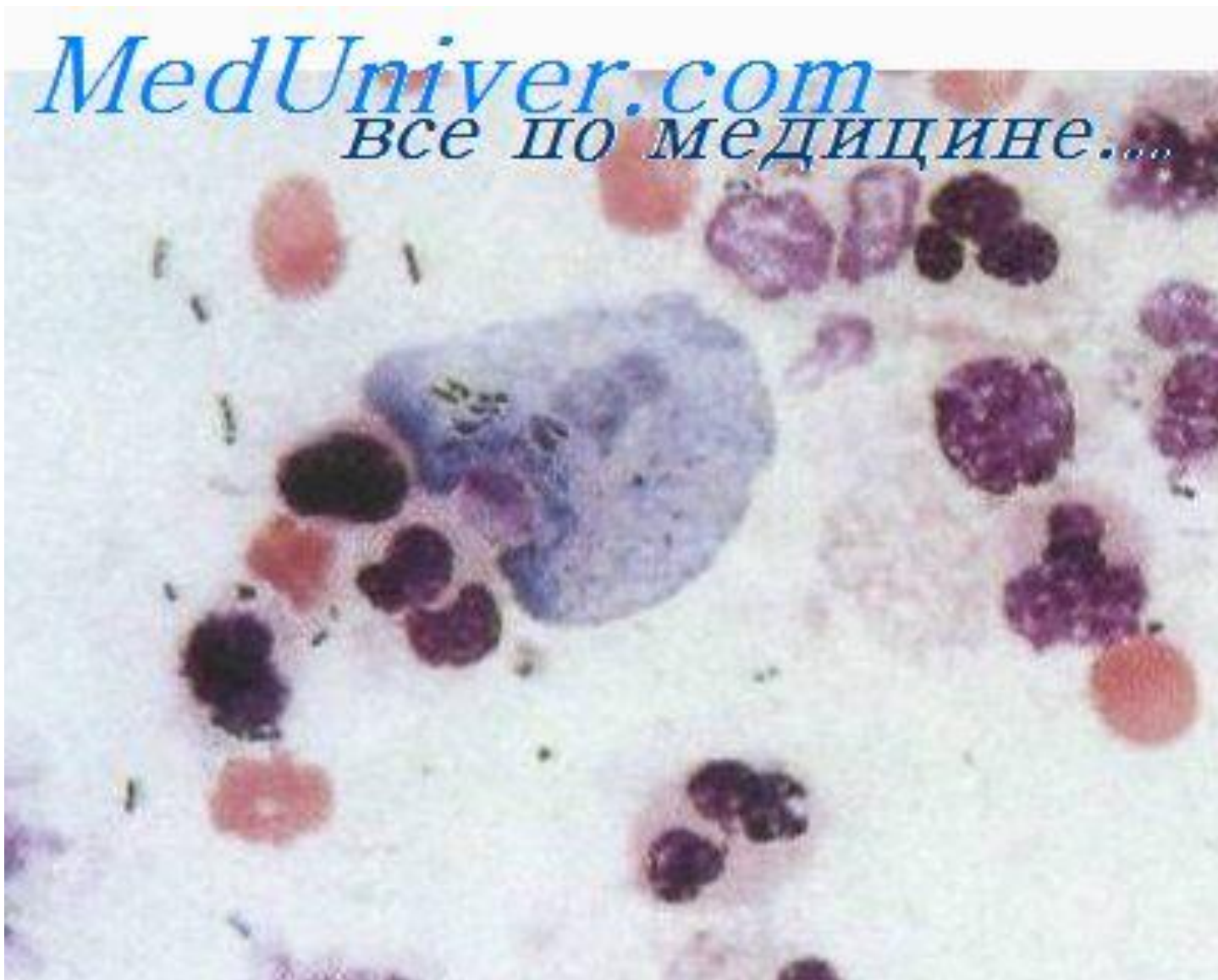
Недостатки

1. Не позволяет верифицировать возбудитель
2. Не позволяет определить чувствительность м/о





MedUniver.com
Все по медицине...



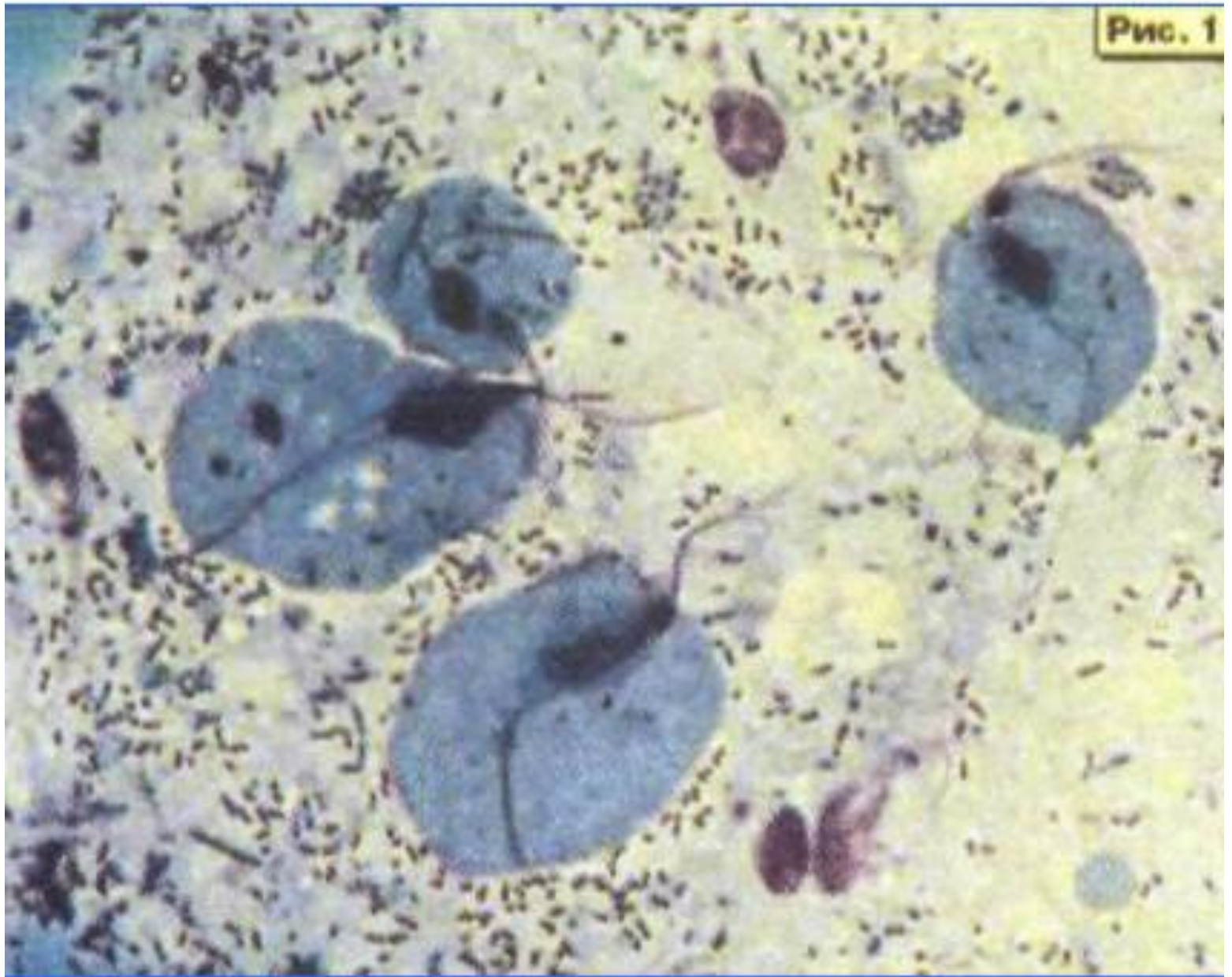


Рис. 1

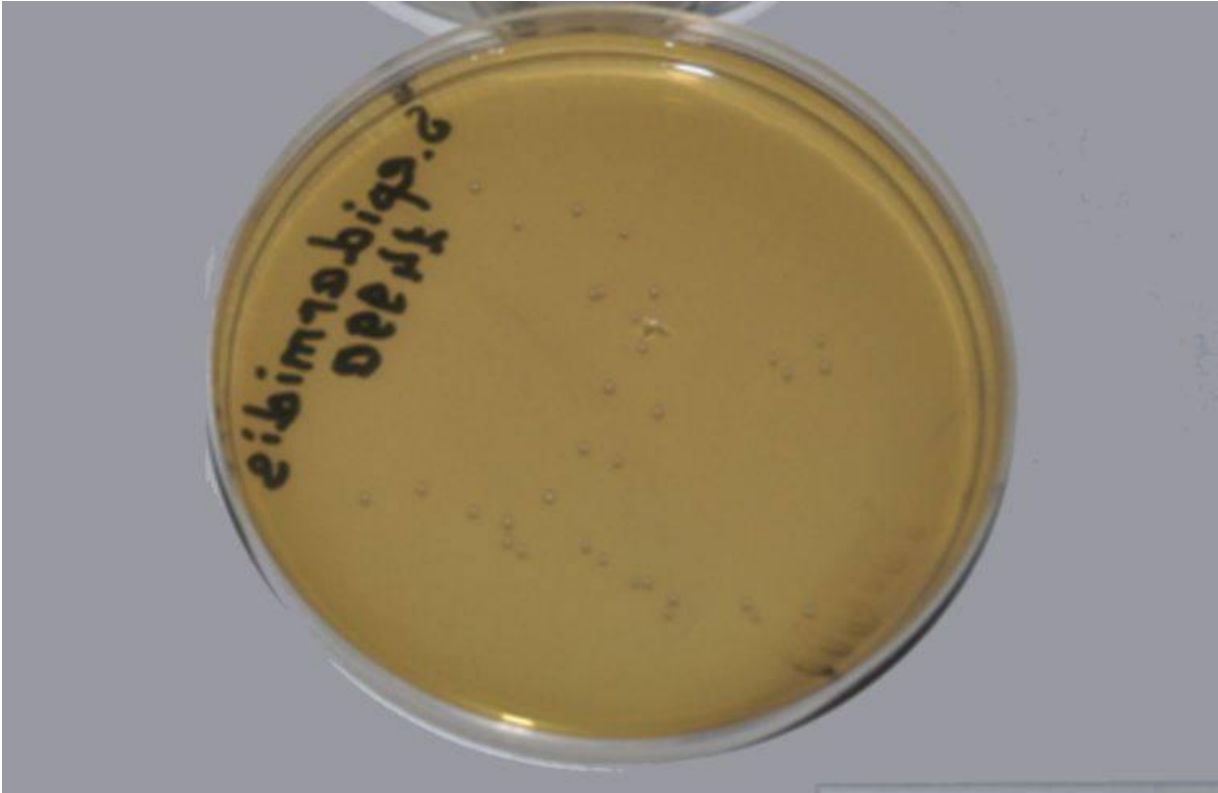
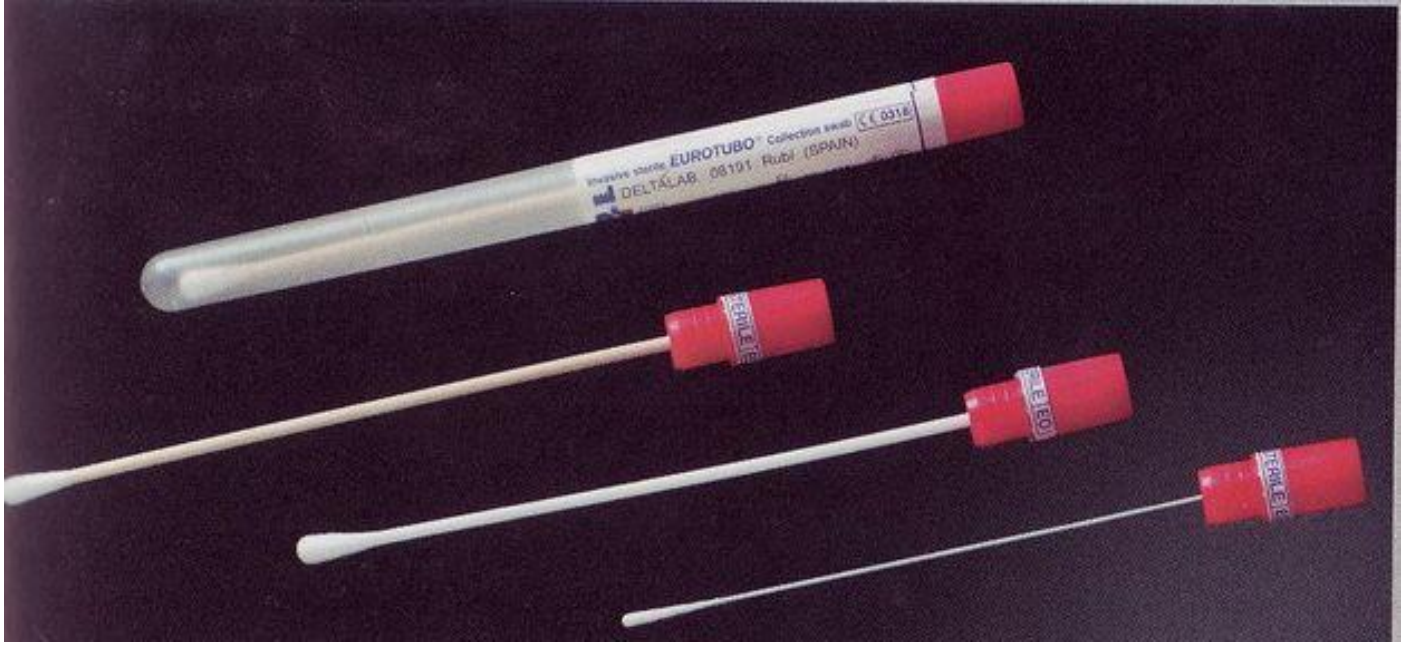
Культуральный метод

Преимущества

1. Верифицирует этиологию возбудителя
2. Дает информацию о чувствительности к антибиотикам
3. Высокоспецифичный метод

Недостатки

1. Низкая чувствительность
2. Не все м/о культивируются
3. Дорогостоящий метод
4. Требуется подготовка пациента (нельзя на фоне приема антибиотиков исследовать)



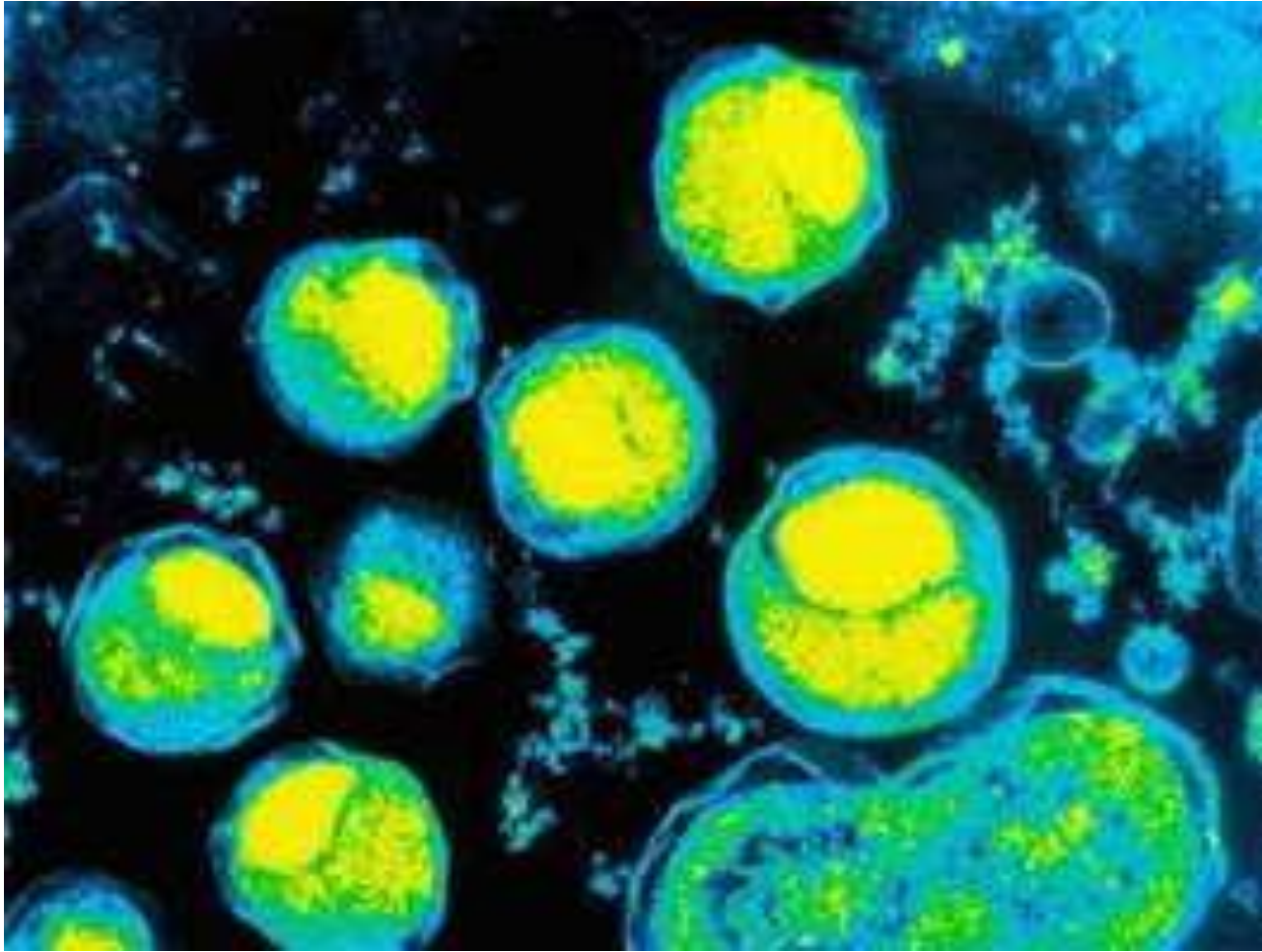
Выявление антигенов к возбудителю (РИФ, ПИФ)

Преимущества

1. Быстрота метода
2. Верифицирует этиологию возбудителя
3. Дает информацию об антигенном составе
4. Высокоспецифичный метод

Недостатки

1. Субъективность метода (результат зависит от квалификации специалиста)
2. Низкая чувствительность метода




ПЦР диагностика

- Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - метод молекулярной диагностики, применяемый в клинической практике для обнаружения специфической НК возбудителя в исследуемом материале.

Преимущества ПЦР-метода

- **Прямое определение наличия возбудителей.**
- **Высокая специфичность.**
- **Высокая чувствительность.**
- **Универсальность процедуры выявления различных возбудителей.**
- **Высокая скорость получения результата анализа**

- 
- Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка НК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*).

Компоненты ПЦР-смеси



Преаналитический этап

Цели

- Правильное определение информативного для ПЦР вида биологического материала.
- Сохранение ДНК возбудителя в материале до момента доставки в лабораторию.
- Препятствие попаданию в материал ингибиторов ПЦР-реакции.
- Предварительная очистка материала для облегчения выделения из него ДНК возбудителя.

Правила взятия материала

Перед забором соскоба из уретры необходимо обработать головку полового члена в области наружного отверстия уретры тампоном, смоченного стерильным физиологическим раствором. Производят массаж уретры. При наличии свободно стекающих из уретры выделений удаляют их сухим тампоном, вводят зонд в уретру на глубину 3-4 см. несколькими вращательными движениями производят соскоб эпителиальных клеток и переносят зонд в пробирку типа «Эппендорф» с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду, вращают зонд в течение 10-15 секунд, избегая разбрызгивания раствора. Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, и отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку. Отделяемое должно забираться в небольшом количестве. Присутствие примесей в виде слизи, крови, гноя недопустимо, так как приводит к ингибированию реакции .

Виды материала для проведения ПЦР-исследования на выявление возбудителей инфекционных заболеваний

- ✓ соскоб эпителиальных клеток
 - ✓ моча
 - ✓ секрет простаты
 - ✓ эякулят
 - ✓ цельная венозная кровь
 - ✓ мокрота
 - ✓ СПИНО-МОЗГОВАЯ ЖИДКОСТЬ, ВЫПОТЫ, СЛЮНА и проч.
- **Все где наиболее вероятно высокая концентрация возбудителя**

Какие особенности влияют на результаты ПЦР анализа?

- В зависимости от периода инфицирования и состояния иммунной системы у любого пациента может быть отрицательный результат даже при наличии инфекции.
В сомнительных случаях рекомендуется провести повторный анализ через 10-14 дней.

Как правильно подготовиться к сдаче ПЦР-анализа?

Выбор клинического материала для исследования определяется наиболее вероятным местом локализации возбудителя. При анализе ЗППП материал для исследования у мужчин – соскоб слизистой оболочки мочеиспускательного канала, который помещается в пробирку со специальным реагентом.

У женщин дополнительно берется на исследование содержимое влагалища, цервикального канала матки, уретры. Решение о выборе материала для исследования принимается врачом на основании совокупности жалоб пациента и клинических проявлений инфекции.

Ингибиторы ПЦР-реакции

Гепарин

Соли тяжелых металлов

Слизь

Кровь (гемоглобин)

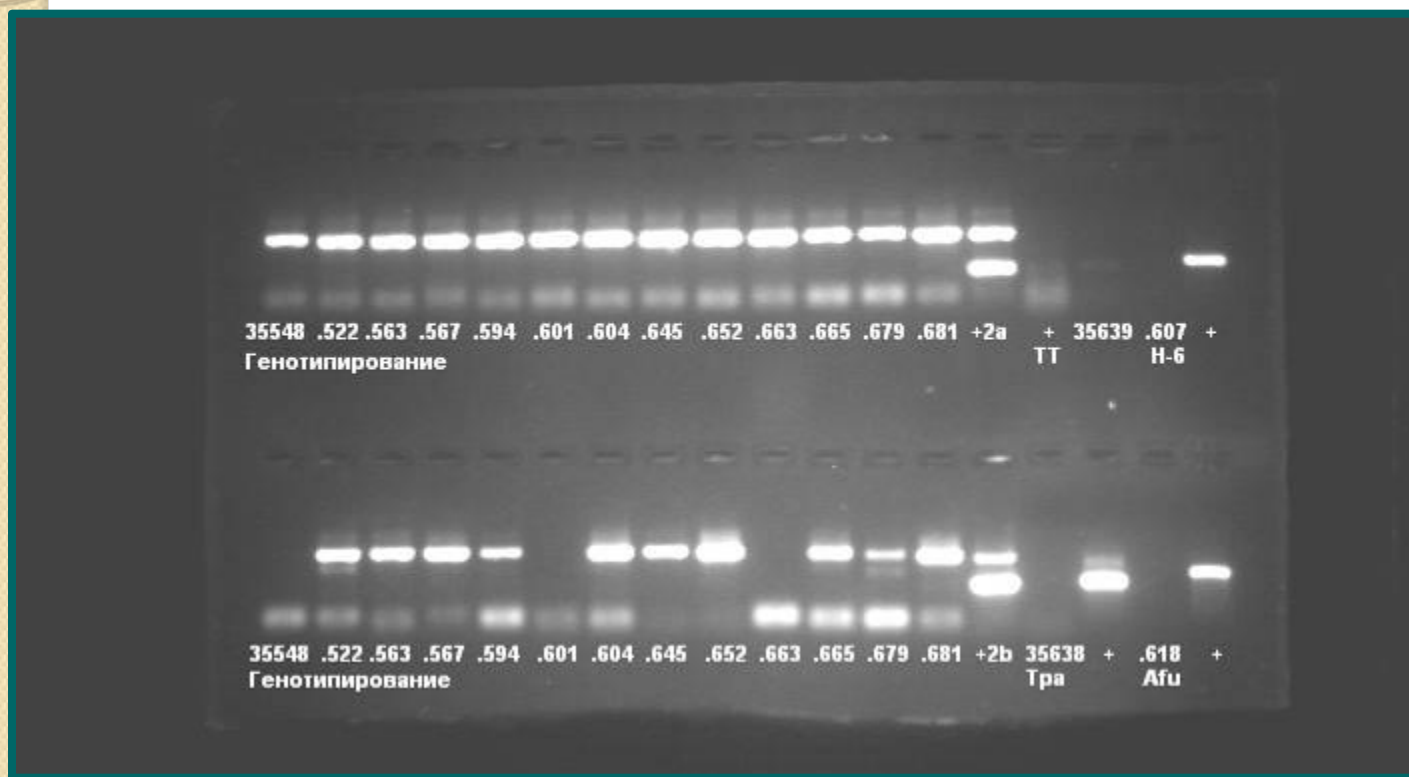
Некоторые лекарственные формы

Мочевая кислота и ее соединения

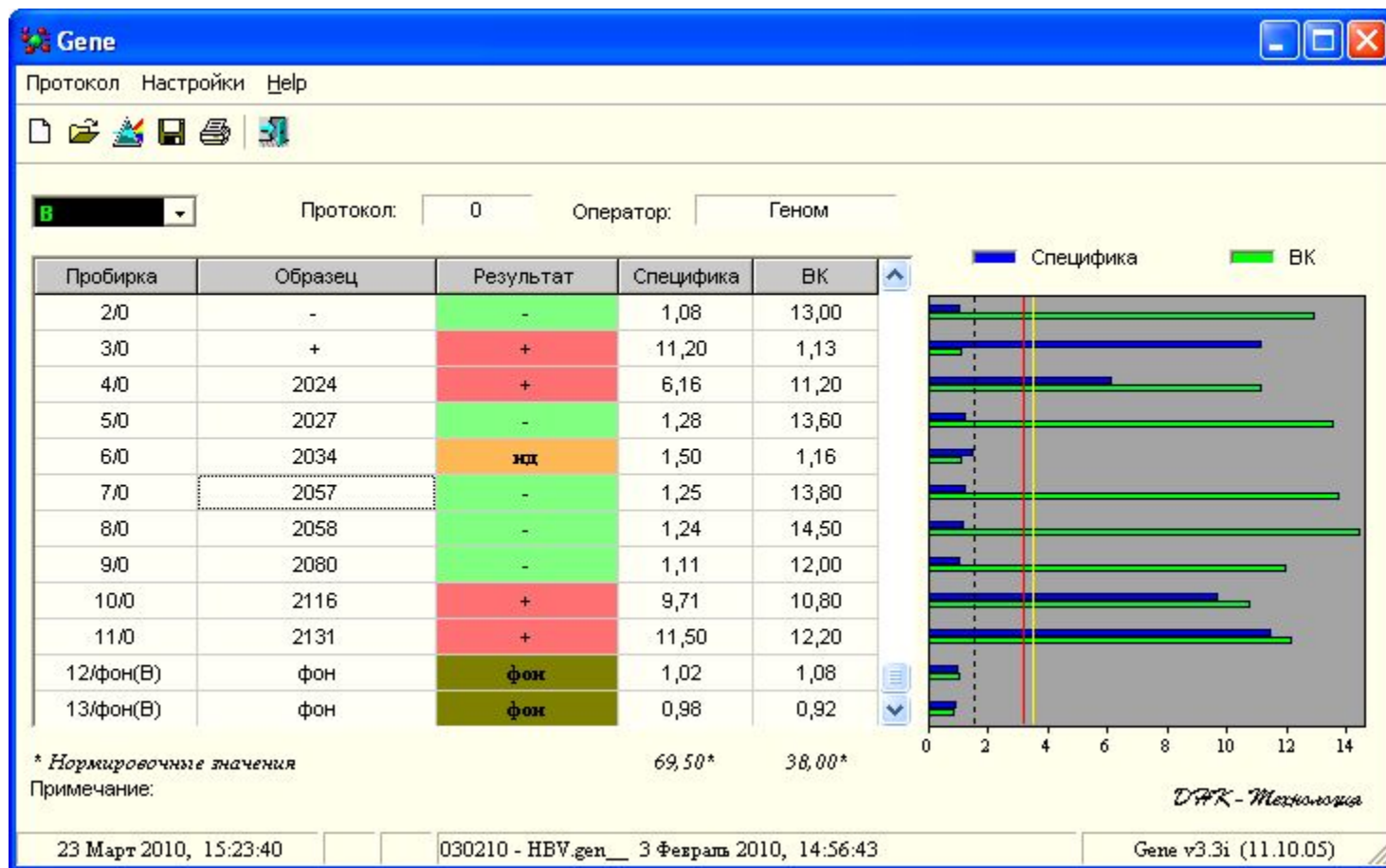
Амплификация



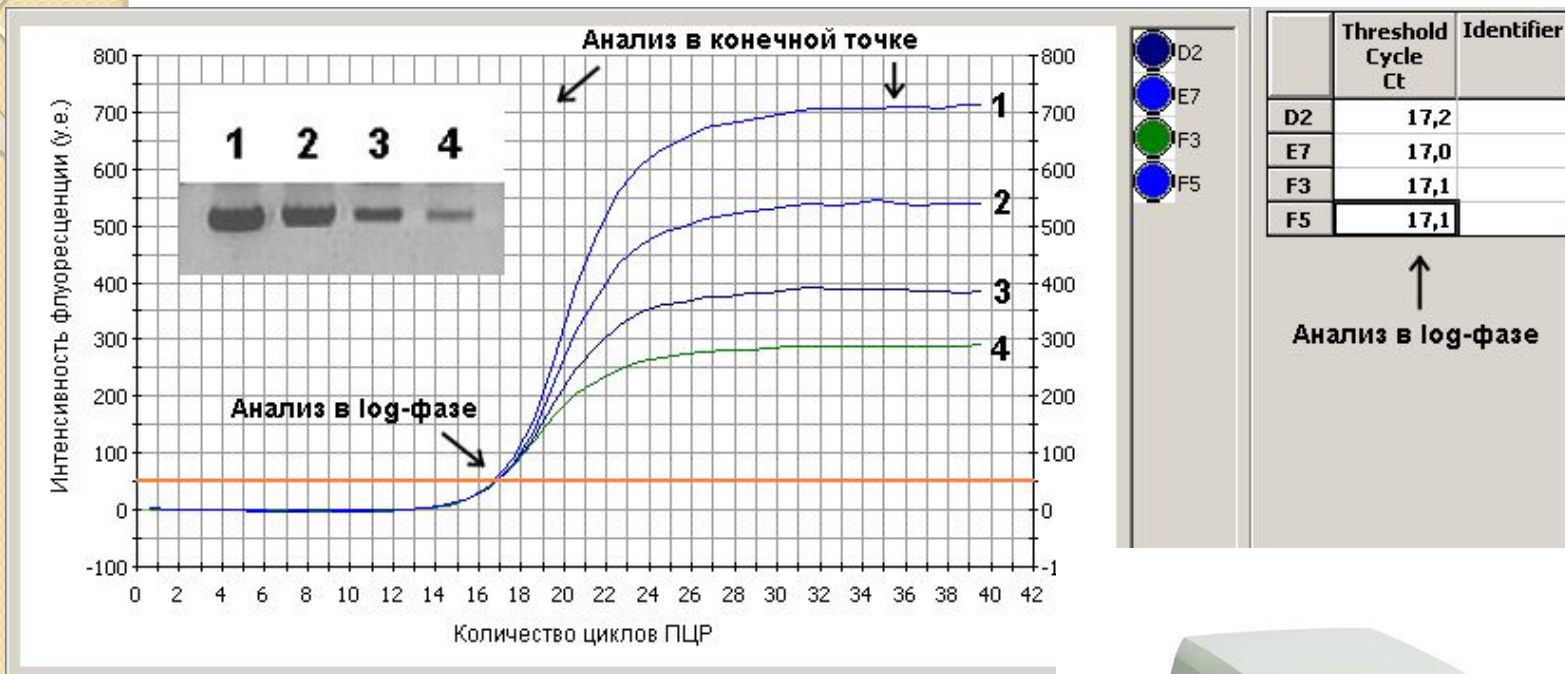
Детекция методом электрофореза



Детекция по конечной точке



Результаты ПЦР на образцах с одинаковым количеством ДНК



Интерпретация результатов

Отрицательный ответ

1. НК возбудителя не обнаружено
2. Концентрация НК ниже 1000 ДНК-копий/мл
3. Неправильно выбран материал для исследования

Положительный ответ

- Присутствие НК возбудителя
- Присутствие фрагментов НК возбудителя



ИФА (иммуноферментный анализ)