

## ПРОТОКОЛЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГОНОРЕЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

КУБАНОВА А.А.<sup>1</sup>, ФРИГО Н.В.<sup>1</sup>, САВИЧЕВА А.М.<sup>2</sup>, СОКОЛОВСКИЙ Е.А.<sup>3</sup>,  
БРИЛЕНЕ Т.<sup>4</sup>, ДЭАК Д.<sup>5</sup>, БАЛЛАРД Р.<sup>6</sup>, ИСОН К.<sup>7</sup>, ХАЛЛЕН А.<sup>8</sup>, ДОМЕЙКА М.<sup>9</sup>, УНЕМО М.<sup>10\*</sup>

ФГУ «Центральный научно-исследовательский кожно-венерологический институт Росмедтехнологий», г. Москва, Российская Федерация<sup>1</sup>; Лаборатория микробиологии Института акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта Российской академии медицинских наук<sup>2</sup>; Кафедра дерматовенерологии с клиникой Санкт-Петербургского Государственного медицинского университета им. И. П. Павлова, Российская Федерация<sup>3</sup>; Лаборатория микробиологии Тартуского университета, Тарту, Эстония<sup>4</sup>; Лаборатория клинической микробиологии Шегедского университета, Шегед, Венгрия<sup>5</sup>; Национальный центр по профилактике ВИЧ, ИППП и туберкулеза, Центр по контролю над инфекционными заболеваниями (CDC), Атланта, США<sup>6</sup>; Национальная референс-лаборатория сексуально передающихся инфекций агентства по защите здоровья (НРА), Лондон, Великобритания<sup>7</sup>; Отделение дерматовенерологии университетского госпиталя в Упсале<sup>8</sup>, Отдел медицинских наук, Упсальский университет, Восточно-европейский комитет шведского общества охраны здоровья<sup>9</sup>, Национальная референс-лаборатория по патогенным нейсериям, отделение клинической микробиологии университетского госпиталя в Оребро<sup>10</sup>, Швеция.

### Введение

Целью создания данного протокола является предоставление всеобъемлющей и точной информации в отношении гонореи — инфекции, передаваемой половым путем (ИППП) — и лабораторной диагностики этого заболевания (обнаружение *Neisseria gonorrhoeae*). Протокол содержит важную информацию для врачей и сотрудников лабораторий, работающих с ИППП, и/или проблемами, связанными с ИППП.

Гонорея относится к инфекциям, передаваемым половым путем, и в случае выявления на территории России подлежит обязательной регистрации. Возбудителем гонореи является грамотрицательный диплококк *Neisseria gonorrhoeae*, входящий в состав семейства *Neisseriaceae* рода *Neisseria*. Это бобовидной формы кокк, клетки которого располагаются парами, вогнутыми сторонами друг к другу. Размеры кокков — 1,25–1,60 мкм в длину и 0,7–0,8 мкм в поперечнике. *N. gonorrhoeae* облигатный патоген в большинстве случаев передается от инфицированного человека при прямом контакте слизистых оболочек. Однако новорожденные могут заразиться при прохождении через родовые пути, если у матери имеется урогенитальная гонококковая инфекция.

У мужчин заболевание чаще всего проявляется острым уретритом, тогда как у женщин гонококковая инфекция в большинстве случаев вызывает эндоцервицит. Бессимптомное носительство с экстрагенитальной локализацией процесса, например, в прямой кишке или глотке, нередко встречается у мужчин, имеющих половые контакты с мужчинами, и может быть выявлена у гетеросексуалов. Бессимптомная инфекция встречается нередко — у мужчин до 10–20% случаев, а у женщин — до 50%.

Определение гонореи, принятое Европейским Союзом [9].

Клиническое описание: клиническая картина гонореи — уретрит, цервицит или сальпингит.

Лабораторные критерии диагноза гонореи:

- выделение *Neisseria gonorrhoeae* из клинического образца;
- выявление антигена или нуклеиновой кислоты *N. gonorrhoeae*;
- обнаружение грамотрицательных внутриклеточных диплококков в мазках из уретры мужчин.

В таблице 1 описаны клинические и анамнестические показания к обследованию на гонококковую инфекцию.

Кроме того, группы риска, где применение скрининга было бы целесообразно с использованием ДНК/РНК-методов, включают:

- лиц, занимающихся коммерческим сексом,
- гомосексуалистов,
- беременных,
- лиц моложе 25 лет, имеющих многочисленных половых партнеров.

**Методы лабораторной диагностики гонококковой инфекции (таблица 2):**

- микроскопические (бактериоскопические),
- культуральные (бактериологические),
- молекулярно-биологические.

Таблица 1

Лица, подлежащие обследованию на гонококковую инфекцию

Пациенты	Показания к обследованию
<b>Мужчины</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• наличие жалоб на гнойные или слизисто-гнойные выделения из уретры, зуд в области уретры, симптомы дизурии,</li> <li>• наличие болей в области придатка яичка или яичка,</li> <li>• наличие болей и выделений из прямой кишки; признаки проктита,</li> <li>• наличие воспалительных изменений в области наружного отверстия уретры, парауретральных ходов,</li> <li>• наличие признаков воспаления предстательной железы,</li> <li>• наличие признаков конъюнктивита</li> </ul>
<b>Женщины</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• наличие воспалительных заболеваний мочеполовой сферы, гнойных или слизисто-гнойных выделений из влагалища, проявлений аднексита, проктита, вульвовагинита, цервицита, ВЗОМТ;</li> <li>• наличие жалоб на появившиеся субъективные расстройства в области половых органов (зуд, жжение при мочеиспускании, боли внизу живота, усиление белей, кровянистые выделения и пр.),</li> <li>• наличие признаков конъюнктивита,</li> <li>• наличие эрозии шейки матки,</li> <li>• бесплодие, привычные выкидыши, преждевременные роды в анамнезе,</li> <li>• направляемые на прерывание беременности,</li> <li>• беременные женщины обследуются трижды: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1-е обследование следует проводить при постановке на учет;</li> <li>• 2-е обследование – при сроке 27–30 недель;</li> <li>• 3-е обследование – при сроке 36–40 недель.</li> </ul> </li> </ul> <p>Вне указанных сроков обследование беременных женщин проводится по показаниям (появление выделений из половых путей, субъективные жалобы и т.д.):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• в гинекологических стационарах обследуются все женщины, не обследованные до госпитализации, перед назначением антибактериального лечения,</li> <li>• в родильных домах обследуются все роженицы без обменных карт;</li> <li>• родильницы с осложненным течением послеродового периода, лучше на 5–6-й день после родов</li> </ul>
<b>Новорожденные</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• с гнойным конъюнктивитом и (или) вульвовагинитом. При подтверждении гонококковой этиологии конъюнктивита и (или) вульвовагинита обследуются родители</li> </ul>
<b>Дети (девочки)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• с симптомами вульвовагинита, вагинита</li> </ul>
<b>Лица</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• вступавшие в половой контакт с больным гонореей,</li> <li>• проходящие обследование на другие ИППП,</li> <li>• у которых диагностирован трихомоноз, до и после лечения последнего;</li> <li>• декретированных профессий при проведении обязательных предварительных (при поступлении на работу) и периодических медицинских осмотров в соответствии с утвержденными регламентирующими документами;</li> <li>• подвергшиеся сексуальному насилию</li> </ul>

### Микроскопические методы исследования

#### Подготовка мазков к окраске

#### Фиксация препаратов в лаборатории

##### Для окрашивания анилиновыми красителями

- В случае если нефиксированный препарат доставляется в лабораторию:
  - препарат фиксируют 96° спиртом или трехкратным проведением стекла через пламя горелки.

##### Хранение мазков

- Фиксированные препараты можно хранить при комнатной температуре в течение нескольких дней.

#### Внимание!

При фиксации над пламенем горелки чрезвычайно важно не перерезать стекло с препаратом, так как клетки, находящи-

еся в препарате, могут разрушиться, и препарат станет непригодным для оценки.

#### Окраска метиленовым синим

Окраска метиленовым синим является ориентировочной и позволяет оценить морфологию и расположение микроорганизмов в мазке. Можно использовать водный или спиртовой растворы метиленового синего. Использование спиртового раствора позволяет сократить время фиксации препарата, не снижая качества окраски.

#### Окраска по методу Грама

При окраске по методу Грама в препарате выявляются тинкториальные свойства бактерий. В зависимости от химической структуры клеточной стенки (наличие или отсутствие теихоевых кислот) бактерии либо обладают способностью удерживать комплекс кристаллического фиолетового с йодом и устойчивы к обесцвечиванию спиртом (грамположительные), либо нет (грамотрицательные).

Таблица 2

Рекомендуемые методы диагностики гонорей

Область взятия материала	Метод диагностики	Комментарии
Уретра (мужчины)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• микроскопический с окраской метиленовым синим и по Граму</li> <li>• культуральный</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• основной метод диагностики гонореи у мужчин с симптомами. Чувствительность и специфичность у мужчин с симптомами &gt; 90% и &gt; 95% соответственно (референс-метод)</li> <li>• применяется для подтверждения диагноза (выделение и идентификация нейссерий) и для мужчин без симптомов;</li> <li>• в оптимальных условиях чувствительность и специфичность до 100% (референс-метод);</li> <li>• применяется для определения чувствительности гонококков к антибиотикам</li> </ul>
	Молекулярно-биологический и иммунологический (обнаружение нуклеиновой кислоты или антигена)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• применяется при исследовании образцов мочи или материалов из уретры только для скрининга с последующим подтверждением другими методами</li> </ul>
Эндоцервикс / уретра (женщины)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• культуральный</li> <li>• микроскопический с окраской метиленовым синим и по Граму</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• является основным методом диагностики;</li> <li>• в оптимальных условиях чувствительность и специфичность до 100% (референс-метод);</li> <li>• обязательно используется для обследования детей, а также женщин в менопаузе;</li> <li>• применяется для определения чувствительности гонококков к антибиотикам</li> <li>• не рекомендуется из-за низкой чувствительности и специфичности</li> </ul>
	Молекулярно-биологический и иммунологический (обнаружение нуклеиновой кислоты или антигена)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• применяется только для скрининга с последующим подтверждением культуральным методом</li> </ul>
Глотка /прямая кишка	<ul style="list-style-type: none"> <li>• культуральный</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• является основным методом диагностики;</li> <li>• в оптимальных условиях чувствительность и специфичность до 100% (референс-метод);</li> <li>• применяется для выделения и идентификации нейссерий;</li> <li>• применяется для определения чувствительности гонококков к антибиотикам</li> </ul>
	Молекулярно-биологический и иммунологический (обнаружение нуклеиновой кислоты или антигена)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• применяется только для скрининга с последующим подтверждением культуральным методом. Пока не существует ни одного ДНК/РНК-метода, обладающего достаточной чувствительностью и специфичностью для экстрагенитальных образцов</li> </ul>
Конъюнктива	<ul style="list-style-type: none"> <li>• микроскопический (окраска метиленовым синим и/или по Граму)</li> <li>• культуральный</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью (референс-метод)</li> <li>• применяется для выделения и идентификации нейссерий;</li> <li>• применяется для определения чувствительности гонококков к антибиотикам</li> </ul>
	молекулярно-биологический	<ul style="list-style-type: none"> <li>• применяется только для скрининга с последующим подтверждением культуральным методом</li> </ul>
Моча (мужчины и женщины)	Молекулярно-биологический и иммунологический (обнаружение нуклеиновой кислоты или антигена)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• применяется только для скрининга с последующим исследованием материала культуральным методом</li> </ul>
	• культуральный	<ul style="list-style-type: none"> <li>• является основным методом диагностики (референс-метод);</li> <li>• применяется для определения чувствительности гонококков к антибиотикам</li> </ul>
Вульва/ вагина (девочки); вагина (женщины после экстирпации матки)	• культуральный	<ul style="list-style-type: none"> <li>• является основным методом диагностики (референс-метод);</li> <li>• применяется для определения чувствительности гонококков к антибиотикам</li> </ul>

**Внимание!**

Чувствительность и специфичность каждого из описанных выше методов в высокой степени зависит от качества взятия проб из соответствующих локализаций, соблюдения условий транспортировки образцов, качественного выполнения метода и правильной интерпретации результатов [5, 16, 33, 39].

При подозрении на диссеминированную гонококковую инфекцию, в добавление к урогенитальным и экстрагенитальным образцам должна быть взята кровь на культуральное исследование.

**Источники ошибок:**

- неудовлетворительное техническое состояние микроскопа затрудняет оценку результата;
- образец взят из несоответствующего клинической ситуации анатомического места;
- нарушение техники взятия клинического материала;
- использование карандаша, не предназначенного для маркировки стекол, в процессе фиксации и окрашивания может загрязнить препарат;
- неправильное нанесение материала на стекло (необходимо прокатывать тампон по стеклу) может привести к повреждению клеток, вследствие чего может быть нарушена их морфология;
- недостаточная фиксация в пламени может привести к удалению материала со стекла во время окраски;
- перегрев во время фиксации может привести к окраске артефактов и повреждению клеток;
- использование раствора Люголя после истечения его срока годности (раствор является пригодным в течение 90 дней при хранении при комнатной температуре);
- при переобесцвечивании мазка грамположительные микроорганизмы могут окраситься как грамотрицательные;
- при недообесцвечивании мазка грамотрицательные микроорганизмы могут окраситься как грамположительные;
- реактивы, загрязненные другими микроорганизмами, могут давать ошибочные результаты

**Контроль качества**

При проведении процедуры окрашивания для микроскопического исследования каждая партия мазков должна содержать контрольные стекла с заведомо грамположительными и грамотрицательными бактериями.

Проведение визуального анализа качества окрашивания препарата (оценка интенсивности окрашивания клеток. Ядра эпителиальных клеток и лейкоцитов окрашены в фиолетовый цвет, а цитоплазма — в розовый цвет).

**Микроскопия окрашенных препаратов**

При проведении микроскопического исследования последовательно оцениваются препараты, окрашенные двумя способами: метиленовым синим и по Граму. Нельзя выносить заключение по результатам просмотра лишь одного препарата.

Окраска метиленовым синим позволяет сделать заключение о наличии воспаления и выявлении морфотипа бактерий. При окраске по Граму возможно выявление грамотрицательных диплококков. При микроскопии препаратов врачом-лаборантом оценивается наличие эпителия, количество лейкоцитов, эритроцитов, морфотип бактерий (лактобациллы, кокки, коккобациллы), наличие вне- и внутриклеточно расположенных диплококков.

Мазки, окрашенные метиленовым синим или по Граму, оцениваются при двух увеличениях (с применением объективов  $\times 10$ ,  $\times 100$ , т.е. при увеличении соответственно в 100 и 1000 раз). Микроскопическое исследование следует начинать с малого увеличения ( $\times 100$ ), позволяющего обнаружить клинический материал на стекле, оценить адекватность взятия из соответствующего анатомического участка,

определить наличие «загрязнений» из других анатомических участков, выбрать участок препарата для дальнейшего исследования при большом увеличении ( $\times 1000$ ). Микроскопия при большом увеличении позволяет выявить и оценить воспалительную реакцию и наличие микроорганизмов.

При увеличении  $\times 1000$  с иммерсией подсчет лейкоцитов следует проводить по меньшей мере в пяти полях зрения. При этом особое внимание следует уделить поиску внутриклеточных диплококков в лейкоцитах.

Диагноз уретрита у мужчин устанавливается на основании обнаружения 4 и более лейкоцитов в поле зрения микроскопа при увеличении  $\times 1000$ .

При наличии цервицита количество полиморфноядерных лейкоцитов повышено (более 10 при увеличении  $\times 1000$ ). При клиническом исследовании следует принимать во внимание наличие или отсутствие слизисто-гнойных цервикальных выделений (зеленовато-желтый гной со слизью на белом ватном тампоне).

При исследовании вагинального мазка у женщин нужно помнить о том, что число лейкоцитов зависит от индивидуальных особенностей организма, — от дня менструального цикла, наличия внутриматочной спирали и т.д. Поэтому для диагностики слизисто-гнойного цервицита рекомендуется использовать оба критерия, т.е. наличие клинических проявлений и воспалительный характер цервикального мазка.

Диагноз уретрита у женщин подтверждается обнаружением более 10 лейкоцитов в поле зрения при увеличении микроскопа  $\times 1000$ . Следует помнить, что если во влагалище и/или шейке матки имеется некий патологический воспалитель-

ный процесс и при этом наблюдаются обильные выделения из влагалища, уретральный мазок всегда «загрязнен» материалом этих выделений (клетки плоского эпителия, лейкоциты, вагинальная микрофлора) и не годится для дальнейшей оценки, поскольку он не имеет ничего общего с уретрой.

#### Оценка результатов микроскопии окрашенных мазков

На основании микроскопического исследования диагноз гонореи устанавливается по трем признакам гонококка:

- его форме;
- расположению;
- окраске.

Только наличие **всех трех признаков** позволяет поставить диагноз. Если же отсутствует хотя бы один из них, требуется культуральное исследование.

Форма гонококка – **диплококк, имеющий форму кофейного зерна** и располагающийся попарно вогнутыми сторонами друг к другу.

Решающее значение при микроскопической диагностике гонореи имеет учет **расположения** диплококков. Гонококки в основном располагаются внутри лейкоцитов и эпителиальных клеток. **На основании обнаружения диплококков, расположенных вне клеток, микроскопический диагноз гонореи не ставится, требуется культуральное исследование.**

**Окраска** гонококков (по методу Грама) – **красно-розовая** (грамотрицательный диплококк). При этом **ядра лейкоцитов и эпителиальных клеток окрашиваются в фиолетовый цвет.**

#### Оценка мазков, окрашенных метиленовым синим

*При микроскопии препарата видны:*

- ядра клеток, окрашенные в синий цвет;
- цитоплазма, окрашенная в голубой цвет разной интенсивности;
- бактериальная микрофлора, окрашенная в синий цвет разной интенсивности.

Окраска метиленовым синим является ориентировочной и позволяет оценить морфологию (форму) и расположение микроорганизмов в мазке (внутри лейкоцита и на эпителиальных клетках).

#### Оценка мазков, окрашенных по Граму

Методика оценки мазка, окрашенного по Граму, принципиально не отличается от методики оценки мазка, окрашенного метиленовым синим (см. выше). Окраска по Граму позволяет выделять в картине мазка красно-розовые (грамотрицательные) или сине-фиолетовые (грамположительные) элементы. Основной целью исследования является выявление грамотрицательных диплококков со специфической морфологией, а также степени выраженности лейкоцитарной реакции.

#### Варианты заключений по результатам микроскопического исследования

По результатам микроскопического исследования формулируется одно из возможных заключений:

- **обнаружены грамотрицательные внутриклеточные и/или внеклеточные диплококки, морфологически сходные с гонококками;**
- **грамотрицательные внутриклеточные и/или внеклеточные диплококки, морфологически сходные с гонококками, не обнаружены.**

#### Внимание!

*В случае обнаружения грамотрицательных диплококков окрашенные препараты (метиленовым синим и по Граму) сохраняют в лаборатории в течение 3 месяцев.*

*Анамнестических данных, клинической картины и положительных результатов микроскопического исследования достаточно для установления диагноза гонореи у мужчин с клиническими симптомами уретрита.*

*При исследовании материала от женщин, детей, в случаях сексуального насилия, при исследовании материалов из ротоглотки, конъюнктивы, прямой кишки необходимо проведение бактериологического исследования для обнаружения *N. gonorrhoeae*.*

#### Культуральное (бактериологическое) исследование

##### Общие положения

Дополнительно к микроскопии окрашенных мазков бактериологическое исследование на гонорею должно всегда проводиться при обследовании:

- детей, так как у них встречается большое количество непатогенных нейссерий, особенно в полости рта, глотки и гениталиях;
- женщин, так как диагностическая чувствительность микроскопии генитальных мазков женщин низкая;
- пациентов с бессимптомной и экстрагенитальной гонореей (глотки, прямой кишки, конъюнктивы и др.);
- сексуальных контактов пациентов с доказанной гонореей (где при микроскопии не удалось выявить возбудителя);
- пациентов с гонореей после окончания лечения (не раньше 10 дней) и при снятии их с учета;
- с целью окончательной идентификации нейссерий;
- для определения чувствительности нейссерий к антибиотикам;
- в случае если будет проводиться фенотипическая и/или генотипическая диагностика ***N. gonorrhoeae***;
- в случае сексуального насилия, при запросе следственных органов и/или судебно-медицинских экспертов.



Ответ по результатам посева при выделении чистой культуры и ее идентификации выдается через 5 дней после взятия пробы.

Посев от больного рекомендуется делать сразу на питательную среду для выделения гонококков. При невозможности этого необходимо использовать специальные транспортные среды.

#### Принцип метода

Выделение *N. gonorrhoeae* в питательной среде с последующей морфологической, биохимической и видовой подтверждающей идентификацией.

#### Транспортировка

Так как гонококки чувствительны к внешним факторам (высушиванию, воздействиям температуры и кислорода), рекомендуется материал, полученный от пациентов, сразу инокулировать на культуральную среду. Если это невозможно, необходимо использовать подходящую транспортную среду (референс-среду или среду, сертифицированную и валидированную для этих целей). Пробирки с инокулированным материалом должны быть помещены либо в холодильник, либо в инкубатор. Образцы должны быть доставлены в лабораторию как можно быстрее и оптимально инокулированы на ростовую среду не позднее чем через 24 часа после взятия материала (максимум — 48 часов). Транспортировка материала должна осуществляться при температуре не ниже 18°C.

#### Питательные среды

Гонококки являются весьма требовательными к составу питательных сред микроорганизмами. Они могут расти только на средах, содержащих определенные концентрации аминокислот, пуринов и пиримидинов, а также усваиваемых источников энергии (т.е. глюкозы, пирувата или лактата). Для того чтобы облегчить идентификацию гонококков в среду для культивирования добавляют антибиотики, подавляющие рост контаминирующих бактерий и грибов, такие как линкомицин и/или ванкомицин; колистин; нистатин, анизомицин или амфотерицин В; триметоприм [16, 26, 39]. Однако в редких случаях некоторые штаммы гонококков могут быть чувствительны к используемым концентрациям ванкомицина и/или триметоприма.

Для выделения патогенных видов *Neisseria*, т.е. *N. gonorrhoeae* и *N. meningitidis* используются селективные культуральные среды, такие как модифицированная среда Thayer-Martin (MTM), Martin-Lewis (ML), New York City (NYC) или GC-Lect среда [12, 16, 25, 34, 39] (или селективная культуральная среда, сертифицированная и валидированная для этих целей в данной стране), которые содержат точные концентрации ингибиторов роста сопутствующей сапрофитной микрофлоры. В идеальном случае в дополнение к селективной среде используется также

неселективная культуральная среда, особенно для проб, полученных из менее контаминированных участков, для того чтобы идентифицировать редкие штаммы, чувствительные к ванкомицину/триметоприму. Однако распространенность таких штаммов незначительна в большинстве стран [39]. Предлагается целый ряд коммерческих культуральных сред, которые могут значительно различаться по способности обеспечивать рост гонококков и подавлять рост других нейссерий и сопутствующей микрофлоры. Таким образом, необходимо использовать эффективные селективные культуральные среды, которые должны быть сертифицированы в данной стране для культивирования гонококков [37, 44].

#### Токсические факторы, влияющие на рост *Neisseria gonorrhoeae*

На жизнеспособность гонококков могут влиять разные факторы. Применение смазок, спермицидных препаратов, спринцеваний, гормональных контрацептивов может отрицательно влиять на выделение гонококков. Кроме того, тампоны для взятия материала могут обладать антибактериальными свойствами. Вата, альгинат кальция, дакрон могут быть токсичными для культуры гонококков. Ненасыщенные жирные кислоты, находящиеся в ватных волокнах, хлорсодержащие отбеливатели, смола, входящая в состав деревянных палочек, клей, используемый для соединения тампонов с крышками, также могут быть токсичными для гонококков.

Быстрый посев на питательные среды рекомендуется для сокращения экспозиции материала с токсическими веществами и предотвращения высыхания его. Ингредиенты среды, такие как крахмал, уголь, кровь и дрожжи, действуют как адсорбирующие вещества и также могут быть ингибиторами роста гонококков.

#### Проведение бактериологического анализа

##### Культивирование нейссерий с использованием питательных сред на чашках Петри

Полученный биологический материал необходимо сразу же поместить одновременно на селективную и неселективную питательную среду, поскольку некоторые штаммы гонококков чувствительны к концентрациям ванкомицина и триметоприма, входящих в состав селективной среды.

Культивирование гонококков следует проводить на чашках Петри диаметром 90 мм с количеством среды не менее 20 мл на чашку или 100 мм с количеством среды 25 мл. Возможно также использование чашек диаметром 40 мм с количеством среды не менее 10 мл. После приготовления чашек со средой они ставятся в термостат при  $36 \pm 1$  °C на 1 час для удаления конденсата (излишней влажности). Пересушивание среды недопустимо, т.к. это отразится на качестве роста гонококков. Готовая среда, разлитая по чашкам, хранится в холодильнике при темпе-

ратуре  $+6\pm 2$  °С до 3 недель в герметично закрытых полиэтиленовых пакетах крышками вниз. Превышение срока хранения среды делает выращивание гонококков неэффективным. Перед проведением посева чашки необходимо прогреть в термостате при температуре  $+36\pm 1$  °С в течение 30 минут.

Клинический материал от каждого пациента должен засеиваться на отдельную чашку Петри. При использовании больших чашек (90 или 100 мм) материал из уретры и цервикального канала у женщин может засеиваться на одну чашку Петри в разные ее секторы с соответствующей маркировкой. Материал из уретры мужчин должен засеиваться на отдельную чашку.

Взятый материал тампоном наносится на поверхность, равную примерно  $j$ -площади поверхности среды чашки или сектора. Затем стерильной бактериологической петлей материал распределяется по оставшейся площади поверхности питательной среды штриховыми движениями в 3–4 разных направлениях с целью создания условий для роста отдельно расположенных колоний гонококков. Чашки немедленно помещаются в анаэробный стат с содержанием  $\text{CO}_2$   $5\pm 2\%$ , влажностью 70%, который ставится в термостат с контролируемой температурой  $36\pm 1$  °С. Допускается использование эксикатора, который ставится в термостат с контролируемой температурой  $36\pm 1$  °С, в эксикаторе создаются условия повышенного содержания  $\text{CO}_2$  при помощи свечи или газогенерирующих пакетов и влажности. Чашки просматриваются через 18–24 часа инкубации, в случае отсутствия роста — через 48 часов.

- При отсутствии признаков роста через 72 часа инкубации наблюдение прекращают.
- При выявлении характерных колоний проводится первичная и видовая идентификация (см. ниже).

**Внимание!**

*Недопустимо использовать пробирки с питательной средой для выделения и идентификации гонококков.*

**Идентификация нейссерий**

**Первичная идентификация нейссерий**

Первичная идентификация нейссерий проводится путем:

- визуальной оценки вида колоний;
- окраски материала из подозрительных колоний по Граму;
- оксидазного теста.

**Оценка вида колоний**

Типичные колонии гонококков через 18–24 часа инкубации выпуклые прозрачные серо-белого цвета, имеют диаметр 0,5–1,0 мм. При дальнейшей инкубации колонии могут увеличиваться в размерах до 3,0 мм и уплощаться. Нередко

на одной чашке можно встретить колонии разного вида.

Большие трудности возникают при идентификации колоний гонококка в посевах из ротоглотки, так как при этом часто вырастают менингококки и непатогенные нейссерии, колонии которых сходны с колониями гонококков. Колонии менингококка выглядят голубоватыми, колонии непатогенных нейссерий — беловатыми, а гонококков — бесцветными, слизистыми. Размер, цвет, морфология и консистенция колоний могут варьировать в зависимости от применяемой питательной среды. Идентифицировать возбудителя можно только при определении сахаролитических свойств культур или другими тестами, подтверждающими видовую принадлежность микроорганизма (см. ниже).

**Применение оксидазного теста**

**Обнаружение оксидазоположительных грамтрицательных диплококков считается достаточным для их идентификации как *N. gonorrhoeae* при рутинной диагностике.**

Для определения цитохром-с оксидазы можно использовать один из рекомендованных методов.

- На подозрительную колонию наносится капля оксидазного реагента (тетраметил-*p*-фенилендиамина, 1%-ный водный раствор). Быстрое изменение цвета реагента, обычно в течение 5–10 секунд, на сине-фиолетовый и его сохранение дольше 30 секунд позволяет считать тест положительным. Реагент, используемый в оксидазном тесте, убивает гонококки, поэтому дальнейшая работа с этими колониями будет невозможна.
- Полоска фильтровальной бумаги смачивается несколькими каплями реагента, затем на нее помещается бактериологической петлей материал из подозрительной колонии. Этот способ позволяет сохранить материал на чашке для проведения дальнейших исследований. Высокая чувствительность оксидазного теста не согласуется с его специфичностью. Оксидазоположительными могут быть и другие бактерии, выделяющие цитохромную оксидазу, поэтому оксидазоположительные колонии микроорганизмов обязательно нужно исследовать микроскопически с окраской по Граму.
- Имеются также коммерческие диски и полоски, содержащие диметил-*p*-фенилендиамина гидрохлорид. Платиновой петлей или стерильной стеклянной палочкой испытуемую культуру наносят на диск, предварительно слегка смоченный дистиллированной водой.

**Учет результата.** Темно-лиловое или синее окрашивание, появляющееся через 10–30 секунд, свидетельствует о положительной оксидазной реакции. Отсутствие изменения цвета — об отсутствии данного фермента.

**Внимание!**

*Во избежание ложноположительных реакций не следует применять стальную или нихромовую проволоку при проведении оксидного теста, так как возможно поверхностное окисление этих металлов.*

*Для учета результатов важно соблюдение временного интервала — 10–30 секунд.*

**Окраска препарата из культур по Граму**

Берут материал из подозрительной колонии, смешивают с небольшой каплей физиологического раствора на предметном стекле, высушивают на воздухе, фиксируют в пламени горелки и окрашивают. При исследовании мазков из культур учитываются морфология, расположение и окраска гонококков. После 18–24 часов культивирования гонококки представляют собой скопления граммотрицательных кокков и диплококков, имеющих более компактное расположение микроорганизмов в центре и разреженное и неравномерное распределение по периферии.

Наряду с интенсивно окрашенными в розово-красный цвет кокками встречаются и бледно окрашенные формы. Более старые культуры (48 часов и более) часто трудно интерпретировать, т. к. отмечается большое количество полностью лизированных клеток. По мере старения культуры увеличивается полиморфность гонококков.

**Внимание!**

*Для оценки качества окрашивания мазка необходимо оценить изменение окраски в зависимости от толщины мазка. При правильной окраске наблюдается изменение цвета от фиолетового к розовому. В первичной культуре наряду с гонококками могут встречаться штаммы стафилококков и стрептококков, которые легко теряют свою первоначальную фиолетовую окраску при обесцвечивании спиртом и в процессе окраски по Граму приобретают розово-красный цвет. В этом случае они ошибочно могут быть приняты за гонококки.*

*Препараты с наличием граммотрицательных кокков и диплококков из культуры должны храниться в лаборатории в течение 3 месяцев.*

**Видовая идентификация**

Проводится при выделении оксидазоположительных граммотрицательных диплококков, для окончательной диагностики *N. gonorrhoeae*, специально полученных из экстрагенитальных локализаций, а также для гонококков, которые должны быть характеризованы серологическими методами и методами генетического типирования и/или затем исследованы на антибиотикочувствительность [3, 39]. Для высокочувствительной и высокоспецифической лабораторной диагностики *N. gonorrhoeae* должны использоваться два подтверждающих метода, основанных на разных принципах [1, 36].

Для подтверждающей идентификации нейссерий используются следующие тесты:

- изучение ферментативной активности;
- иммунологические тесты (прямая иммунофлюоресценция, коаггутинация);
- молекулярно-биологические методы (ПЦР).

**Изучение ферментативной активности**

Ферментативная активность *Neisseria gonorrhoeae* изучается в реакции окисления сахара. Реакция может быть ложноположительной из-за контаминации исследуемых культур гонококков другими бактериями и ложноотрицательной при использовании гонококков, культивируемых более 24 часов (вследствие аутолиза микроорганизмов). Для предупреждения этих возможных факторов необходимо выделить чистую культуру гонококков путем пересева типичных колоний на чашки Петри с неселективной средой (шоколадный агар). Инкубация проводится в течение 18–24 часов.

**Внимание!**

*Первичная культура гонококков непригодна для изучения их ферментативной активности, т. к. она может содержать другие микроорганизмы, что может привести к ложному результату.*

Изучение ферментативной активности *Neisseria gonorrhoeae* может проводиться в ростозависимых и ростонезависимых тестах. При проведении ростозависимых тестов сахара и другие субстраты (например, феноловый красный) вводятся непосредственно в питательную среду, на которой осуществляется рост гонококка. Однако в настоящее время эти тесты не могут быть рекомендованы, т. к. широко используемые ростонезависимые тесты дают возможность получить более быстрый (в течение нескольких часов) и специфический результат, позволяя идентифицировать исключительно *Neisseria gonorrhoeae* и исключить другие непатогенные нейссерии. Существуют коммерческие наборы для изучения ферментативной активности *Neisseria gonorrhoeae* [4, 6, 7, 16, 18, 19, 29, 32, 39, 42]. Оценка проводится по изменению цвета среды: при ферментации сахаров — от красного к желтому (результат положительный). Энзимсубстратные тесты с использованием ферментов (орто-нитрофенил-бета-галактозидаза (ONPG), гамма-глутамил-аминопептидаза (GLU-AMP), гидроксипролил-аминопептидаза (PIP), гидроксипролин-аминопептидаза (HRA), пролин-аминопептидаза (Pro-AP)) предназначены в основном лишь для быстрой дифференциации между *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica* и некоторыми штаммами *N. cinerea* и *M. Catarrhalis* [6, 16, 39]. Результаты теста считаются положительными, если происходит изменение цвета среды — от бесцветного к желтому для ОФГ и от светло-желтого к интенсивно оранжевому для



Таблица 3

Ферментативная активность бактерий рода *Neisseria* и *Moraxella catarrhalis*

Виды нейссерий	Ферментативная активность							
	Глюкоза	Мальтоза	Лактоза	Сахароза	Фруктоза	ОФГ*	Глю-АП**	Про-АП***
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	0	0	0	0	0	0	+
<i>N. meningitidis</i>	+	+	0	0	0	0	+	0/+
<i>N. lactamica</i>	+	+	+	0	0	+	0	+
<i>N. cinerea</i>	0	0	0	0		0	0	+
<i>N. sicca</i>	+	+	0	+	+			
<i>N. mucosa</i>	+	+	0	+	+			
<i>N. flava</i>	+	+	0	0	+			
<i>N. subflava</i>	+	+	0	+/0	+/0			
<i>N. perflava</i>	+	+	0	+	+			
<i>N. flavescens</i>	0	0	0	0	0			
<i>M. catarrhalis</i>	0	0	0	0	0			

\* ОФГ — орто-нитрофенил-бета-галактозидаза.  
 \*\* Глю-АП — гамма-глутамил аминопептидаза.  
 \*\*\* Про-АП — гидроксипролил аминопептидаза.  
 + Изменение цвета среды, свидетельствующее о ферментации.  
 0 Отсутствие изменения цвета среды (отсутствие ферментации).  
 +/- Признак непостоянный у одного и того же штамма.

Глю-АП и Про-АП. Однако чувствительность и специфичность этих быстрых энзимсубстратных тестов оказались неоптимальными [1, 16, 36, 39].

Результаты тестов утилизации сахаров и продукции ферментов для разных видов *Neisseria* и *Moraxella catarrhalis* представлены в таблице 3.

Проведение видовой идентификации возможно также с использованием бактериологических анализаторов и коммерческих наборов реагентов.

**Иммунологические/антигенные подтверждающие тесты**

Иммунологические тесты рекомендуется использовать только в референс-лабораториях для окончательного подтверждения *N. gonorrhoeae* [1, 7, 20, 36, 39].

Иммунологические тесты с использованием моноклональных антител для прямой иммунофлюоресценции (ПИФ), коаггутинации и иммуноферментного анализа являются высокочувствительными и специфичными для точной идентификации *N. gonorrhoeae*. Эти тесты могут проводиться с культурой нейссерий, выделенных при первичном посеве. При этом не требуется выделение чистой культуры гоно-

кокков, и изоляты могут быть идентифицированы на 18–24 часа раньше, чем при изучении ферментативной активности *N. gonorrhoeae*. Однако эти тесты дороже, чем ферментативные, коммерческие тест-системы имеют меньший срок годности.

**Прямая иммунофлюоресценция**

Тест в большинстве случаев основан на использовании флуоресцирующих моноклональных антител против очищенного ProB белка наружной мембраны гонококка, ранее называвшегося I или главный белок наружной мембраны гонококка [1, 16, 39]. Очень важно строгое следование инструкции производителя каждого отдельного теста.

**Коаггутинационные тесты**

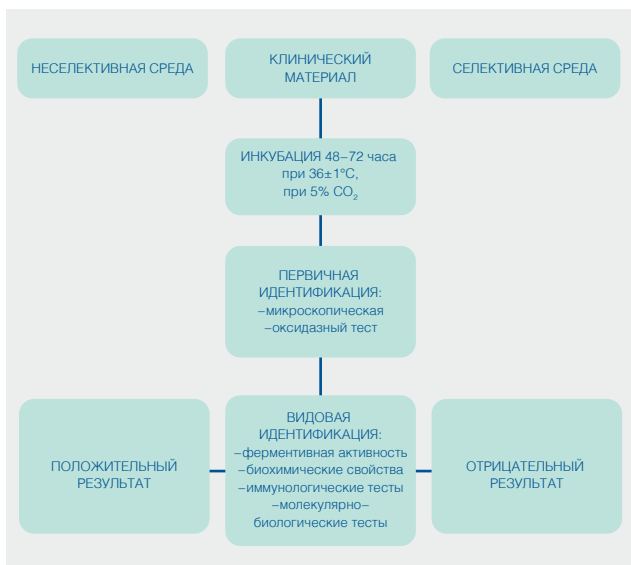
*Staphylococcus aureus* (штамм Covan) является богатым поверхностным протеином А, который связывается с Fc-фрагментом иммуноглобулина G 2 и 4 субклассов, оставляя Fab-фрагмент свободным для реагирования с антигеном. Убитые прогреванием стафилококки, покрытые антигонококковыми антителами, смешивают с суспензией

гонококков, что приводит к появлению хлопьев (агглютинации). Коммерческие наборы используют моноклональные антитела к белку Por B, раньше называемого белком I или белком наружной мембраны гонококков. Моноклональные антитела к PorB локализуются на внешней мембране *N. gonorrhoeae*. В высокочувствительных и специфических коммерческих тестах моноклональные антитела к белку PorB гонококка конъюгированы с коллоидным золотом вместо протеина А стафилококка. Очень важно строгое следование инструкции производителя каждого отдельного теста [1, 16, 36, 39].

#### Внимание!

Для реакции коаггутинации необходимо использовать 18–24-часовую культуру гонококков. Колонии после 48 часов инкубации трудно суспендировать гомогенно из-за высвобождения нуклеопротеина из аутолизированных микроорганизмов. Необходимо строго придерживаться инструкции изготовителя тест-систем для коаггутинации в вопросах проведения процедуры, использования контроля и интерпретации результатов. Некоторые штаммы *N. gonorrhoeae* могут давать слабую реакцию, и её очень важно отличать от ложноположительной реакции, вызванной, например, спонтанной агглютинацией.

#### Алгоритм выделения и идентификации *N. gonorrhoeae*



#### Контроль качества бактериологического исследования на *N. gonorrhoeae*

Некоторые проблемы культурального исследования на гонококки и способы их решения представлены в таблице 4.

Таблица 4

Культуральное исследование на гонококки: возможные проблемы и их решение

Система	Возможная проблема	Решение
Селективная среда	Неправильная концентрация антибиотиков Токсичность агара Дегидратация среды Неправильное количество среды на чашку	Строгое соблюдение инструкции по приготовлению и хранению среды Контроль качества среды на пригодность для выращивания чувствительного штамма <i>N. gonorrhoeae</i> Контроль качества среды на подавление роста контрольных штаммов <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Neisseria sicca</i> <i>Candida albicans</i>
Взятие материала и посев на среду	Неправильное взятие материала Неправильная транспортировка образцов Неправильное нанесение материала на среду Поздно проведенный посев	Строгое соблюдение инструкции по взятию материала врачом-клиницистом Строгое соблюдение инструкции по транспортировке образцов Строгое соблюдение инструкции по правилам посева для врача лаборатории
Инкубация	Концентрация CO <sub>2</sub> слишком низкая Слишком высокая/низкая температура Слишком низкая влажность Время инкубации слишком короткое	Строгое соблюдение правил инкубации Контроль концентрации CO <sub>2</sub> Контроль температуры Контроль влажности
Оценка результатов	<ul style="list-style-type: none"> <li>Рост колоний, не характерных для <i>N. gonorrhoeae</i></li> <li>Рост <i>N. meningitidis</i>, <i>N. lactamica</i> и других нейссерий</li> <li>Рост сопутствующей сапрофитной микрофлоры</li> <li>Неправильная интерпретация оксидазной реакции</li> <li>Неправильная интерпретация микроскопического исследования</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Строгое соблюдение правил контроля качества среды</li> <li>Соблюдение инструкции по идентификации гонококков</li> </ul>

### Контроль качества среды

Каждую новую партию среды необходимо контролировать на способность поддерживать рост гонококков. Это производится путем посева референс-штаммов гонококков. Каждая новая партия среды должна с использованием референс-штаммов быть исследована на ингибиторные свойства по отношению к другим бактериям и грибам путем использования таких референс-штаммов, как *E. coli*, *S. epidermidis*, *N. sicca* и *C. albicans*, а также на стерильность (путем инкубации образца среды в термостате в течение 2 дней).

### Контроль качества окраски по Граму

Каждая новая серия реактивов для окрашивания по Граму должна быть проверена на качество при помощи грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий. Дополнительно каждый раз при проведении окраски (или если в лаборатории окрашивается мало материалов, то 1 раз в неделю) те же референс-штаммы должны быть включены как контрольные.

### Контроль качества реактивов для оксидазного теста

Для оценки качества оксидазного реагента обязательно используются как положительный, так и отрицательный контроли:

- **положительный контроль** *Pseudomonas aeruginosa* (к примеру ATCC 27853), *Neisseria gonorrhoeae* (к примеру ATCC 19424),
- **отрицательный контроль** *Staphylococcus aureus* (к примеру ATCC 25923), *Escherichia coli* (к примеру ATCC 25922).

### Контроль качества для ферментации сахаров и хромогенных энзимсубстратных тестов

Каждая новая серия реактивов должна пройти контроль качества при использовании референс-штаммов соответствующих бактерий, например, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. sicca*, *N. lactamica* и *M. catarrhalis*. Каждый раз, когда проводится видовая идентификация, те же референс-штаммы должны использоваться в качестве контроля.

### Контроль качества иммунологических/антигенных методов идентификации

Каждая новая серия реагентов должна пройти контроль качества с использованием референс-штаммов *N. gonorrhoeae* (положительный контроль) и других бактерий (отрицательный контроль). Оба эти контроля должны использоваться каждый раз при проведении исследования.

### Форма ответа результата бактериологического исследования

- *Neisseria gonorrhoeae* выделены.
- *Neisseria gonorrhoeae* не выделены.

## Некультуральные методы диагностики гонококковой инфекции

### Молекулярно-биологические методы

#### Общие положения

Для выявления *N. gonorrhoeae* могут быть использованы ДНК/РНК методы (молекулярно-биологические методы, МБМ), такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР), strand displacement amplification (SDA) или transcription mediated amplification (ТМА), а также методы, основанные на гибридизации. Существует много коммерческих методов, позволяющих определять *N. gonorrhoeae* с высокой чувствительностью и в большинстве случаев с высокой специфичностью [5, 13, 16, 21, 23, 24, 27, 28, 31]. Однако результаты, полученные при использовании этих методов, должны оцениваться в связи с клинической ситуацией, так как после проведенного лечения гонореи в некоторых случаях ДНК может определяться в образцах до 2–3 недель после лечения [2, 16].

Однако с целью получения живого микроорганизма и для определения чувствительности к антибиотикам проведение бактериологического исследования является необходимым у пациентов с клинической симптоматикой. В некоторых ситуациях молекулярно-биологические методы являются более чувствительными, чем культуральный метод. Чувствительность культурального метода во многом определяется качеством питательной среды и условий транспортирования образца в лабораторию. При соблюдении условий транспортировки клинического материала в лабораторию, использовании качественных питательных сред, строгого проведения условий лабораторного исследования бактериологическое исследование является методом выбора, и наоборот.

Следовательно, выбор молекулярно-биологического или культурального метода зависит от организационных условий и качества проведения лабораторного исследования, а также от эпидемиологической ситуации в популяции. В популяции с повышенным риском распространения заболевания бактериологическое исследование является методом выбора. В популяции низкого риска, для скрининга и для исследования неинвазивных образцов, молекулярно-биологические методы подходят больше (к примеру, исследование мочи у мужчин и вагинальных образцов у женщин). Однако если метод используется для исследования популяции низкого риска и он не является высоко специфичным, возможно получение большого количества ложноположительных результатов. Молекулярно-биологические методы являются оптимальными для исследования образцов, полученных неинвазивным способом, но их чувствительность и специфичность переменны [5, 7, 13, 16, 21, 23, 24, 27, 28, 31]. Чувствительность

молекулярно-биологических методов обычно выше при исследовании образцов мочи у мужчин, по сравнению с женскими образцами. Оптимальным для женщин является исследование вагинальных материалов.

При исследовании пациентов без клинических симптомов заболевания молекулярно-биологические методы обязательно должны подтверждаться бактериологическим методом. Пока еще нет лицензированных молекулярно-биологических методов для исследования ректальных или фарингеальных образцов. ДНК/РНК-методы могут быть использованы для видового подтверждения *N.gonorrhoeae* из культур. Для этой цели материал, собранный петлей из специфической колонии, может быть перенесен в пробирку типа Эппендорф или любую другую пробирку со 100 мкл забуференного физиологического раствора. Однако этот тест не исключает необходимости предварительной идентификации *N.gonorrhoeae* (см. выше).

Для проведения молекулярно-биологических методов из клинического образца необходимо выделить ДНК в соответствии с инструкцией изготовителя.

#### Внимание!

*Молекулярно-биологические методы не рекомендуются как единственный метод диагностики.*

Краткая характеристика некоторых некультуральных методов диагностики, основанных на выявлении нуклеиновых кислот *N.gonorrhoeae*, приведена в таблице 5.

Таблица 5

Некультуральные коммерческие методы диагностики, основанные на выявлении нуклеиновых кислот *N.gonorrhoeae*

Генетическая мишень	Метод
16S рРНК	Гибридизация с зондом
Хромосомные и плазмидные последовательности	Гибридизация с зондом
Ген цитозин ДНК метилтрансферазы	PCR (в том числе в формате реального времени)
Гены Ора	LCR
16S рРНК	NASBA (в формате реального времени)
16S рРНК	TMA
Ген <i>pivNG</i>	SDA (в формате реального времени)

Методы предназначаются для обнаружения *N.gonorrhoeae* в урогенитальных пробах. В большинстве случаев молекулярно-биологические методы имеют высокую чувствительность и специфичность [5, 7, 13, 16, 21, 23, 24, 27, 28, 31]. Однако наличие субстанций ингибиторов в некоторых образцах [22], а также тот факт, что у некоторых штаммов *N.gonorrhoeae* может не быть последовательности, являющейся мишенью для молекулярно-биологического метода [30], может приводить к снижению чувствительности метода. Известна недостаточная специфичность некоторых ДНК/РНК-методов, и получено большое количество ложноположительных результатов из-за перекрестных реакций с комменсальными видами нейссерий, таких как *N.lactamica*, *N.cinerea*, *N.subflava* [11, 16, 38]. Высокую специфичность показали новые методы ПЦР-анализа, использующие праймеры, направленные на *PogA* псевдоген *N.gonorrhoeae*. Этот ген (*PogA*)/псевдоген подходит для дифференциальной диагностики *N.gonorrhoeae* и *N.meningitides* [14, 35, 40, 41]. Для всех экстрагенитальных образцов или для определения антибиотикочувствительности должно проводиться культивирование с последующей идентификацией нейссерий до вида.

#### Проведение анализа

##### Выделение ДНК и проведение амплификации

Проводится строго в соответствии с инструкцией производителя диагностических наборов. Необходимо строгое соблюдение инструкций по уборке помещений и обработке поверхностей. После окончания работы рабочие поверхности должны обрабатываться ДНК/РНК деградирующими растворами для удаления ранее амплифицированных нуклеиновых кислот.

##### Интерпретация результатов

Не вызывает сомнения, что разработка и внедрение диагностических методов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, позволяют существенно улучшить диагностику гонореи, так же как и многих других инфекционных болезней. Однако особое внимание следует уделять правильной интерпретации результатов молекулярно-биологических тестов, даже если в целом они имеют хорошие диагностические характеристики. Это особенно важно в случае применения этих методов для скрининга гонореи в популяциях с низкой распространенностью инфекции. Так, при распространенности заболевания в популяции 50% диагностический тест с чувствительностью и специфичностью 95% выявляет инфицированных и неинфицированных индивидуумов в 95% случаев, тогда как при распространенности инфекции 5% данный тест имеет прогностическую значимость положительного результата только 50% (процент лиц с позитивным тестом, которые действительно инфицированы).

Таблица 6

Прогностическая значимость положительного и отрицательного результата диагностического метода с чувствительностью и специфичностью 95% в зависимости от распространенности инфекции в популяции

Распространенность заболевания (%)	Прогностическая значимость положительного результата (%)	Прогностическая значимость отрицательного результата (%)
1	16,1	99,9
2	27,9	99,9
5	50,0	99,7
10	67,9	99,4
20	82,6	98,7
50	95,0	95,0
75	98,3	83,7
100	100,0	—

Таблица 7

Прогностическая значимость положительного результата диагностического метода в зависимости от уровня чувствительности и специфичности при распространенности инфекции в популяции 2%

Специфичность (%)	Чувствительность (%)							
	50	60	70	80	90	95	98	99
50	2,0	2,4	2,8	3,2	3,5	3,7	3,8	3,8
60	2,5	3,0	3,4	3,9	4,4	4,6	4,8	4,8
70	3,3	3,9	4,5	5,2	5,8	6,1	6,2	6,3
80	4,8	5,8	6,7	7,6	8,4	8,8	9,1	9,2
90	9,2	10,9	12,5	14,0	15,5	16,2	16,7	16,8
95	17,0	19,7	22,2	24,6	26,9	27,9	28,6	28,8
98	33,8	38,0	41,7	44,9	47,0	49,2	50,0	50,2
99	50,5	55,0	58,8	62,0	64,7	66,0	66,7	66,9

цированы). Что касается прогностической значимости отрицательного результата, то он составляет 99,7% (процент лиц с негативным тестом, которые действительно свободны от инфекции) (таблица 6).

Например, при распространенности гонореи в популяции 2% метод с чувствительностью 90% и специфичностью 98% будет иметь прогностическую значимость положительного результата только 47,9% (таблица 7). Даже при чувствительности и специфичности теста 99% прогностическая значимость положительного результата в данном случае будет 66,9%.

Эти данные подтверждают, что нужно быть очень осторожными с интерпретацией результатов в группах с низким риском инфицирования, т. к. высокий уровень ложноположительных результатов в этих случаях может повлечь за собой неоправданное привлечение к обследованию половых партнеров.

#### Контроль качества

Внутренний контроль, добавляемый на стадии выделения ДНК, позволяет судить о наличии в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию, а также о качестве пробоподготовки.



Для внутри- и межлабораторного контроля качества ПЦР-диагностики производители тест-систем выпускают референс-панели, представляющие собой зашифрованные контрольные образцы. Назначением панели стандартных образцов является стандартизация работы ПЦР-тест-систем на основе показателей чувствительности, специфичности и воспроизводимости вне зависимости от серии набора, а также стандартизация работы ПЦР-лаборатории вне зависимости от используемых ПЦР-тест-систем.

#### Форма ответа

- ДНК *Neisseria gonorrhoeae* не обнаружена.
- ДНК *Neisseria gonorrhoeae* обнаружена.

#### Серологические методы

Разработано несколько серологических реакций для обнаружения антител к *N. gonorrhoeae*, таких как реакция связывания комплемента, латексагглютинации, иммунофлюоресценции и др. Однако ни одна из серологических реакций не позволяет отличить текущую инфекцию от инфекции, перенесенной в прошлом. Поэтому с целью диагностики гонореи серологические реакции не используются.

#### Сохранение выделенных культур *N. gonorrhoeae*

При необходимости жизнеспособную культуру *N. gonorrhoeae* можно поддерживать ежедневными посевами на питательной среде.

На короткий период времени (не более одного месяца) свежую культуру можно сохранять в холодильнике при  $-20^{\circ}\text{C}$ , помещая в пробирки с криосредой. Длительное хранение при этой температуре нежелательно, так как гонококки могут быстро терять жизнеспособность.

Для более длительного хранения (в течение нескольких месяцев – 3–5 лет) культуру в среде для замораживания поместить в холодильник при  $-40$ – $70^{\circ}\text{C}$ .

Штаммы гонококка могут также сохраняться путем лиофилизации или заморозки в жидком азоте (более 5 лет).

#### Контроль качества

Постоянно проводимая программа контроля качества должна быть частью постоянной работы каждой микробиологической лаборатории. На качество работы по диагностике гонореи могут повлиять качество и состав питательных сред, реагенты, оборудование и лабораторный персонал.

Во всех лабораториях должны быть единые принципы работы с клиническим материалом и результаты исследований, выполняемых по одним и тем же методикам, должны быть сопоставимы.

Этой цели служат разработанные международные стандарты по контролю качества ISO 15189, 2003 «Медицинские лаборатории — специальные требования к качеству и компетентности», которые

должны руководствоваться все лаборатории, занимающиеся диагностикой ИППП.

#### Литература

1. Alexander, S., and C. Ison. 2005. Evaluation of commercial kits for the identification of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Med. Microbiol. 54: 827–831.
2. Bachmann, L. H., R. A. Desmond, J. Stephens, A. Hughes, and E. W. Hook III. 2002. Duration of persistence of gonococcal DNA detected by ligase chain reaction in men and women following recommended therapy for uncomplicated gonorrhea. J. Clin. Microbiol. 40: 3596–3601.
3. Bignell, C. J.; European branch of the International Union against Sexually Transmitted Infection and the European Office of the World Health Organization. 2001. European guideline for the management of gonorrhoea. Int. J. STD. AIDS. 12 (suppl 3):P27–29.
4. Brown, W. J. 1974. Modification of the rapid fermentation test for *Neisseria gonorrhoeae*. Appl. Microbiol. 27:1027–1030.
5. Cook, R. L., S. L. Hutchison, L. Illstergaard, R. S. Braithwaite, and R. B. Ness. 2005. Systematic review: noninvasive testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Ann. Intern Med. 142: 914–925.
6. D'Amato, R. F., L. A. Eriquez, K. M. Tomfohrde, and E. Singerman. 1978. Rapid identification of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* by using enzymatic profiles. J. Clin. Microbiol. 7: 77–81.
7. Dillon, J. R., M. Carballo, and M. Pauze. 1988. Evaluation of eight methods for identification of pathogenic *Neisseria* species: Neisseria-Kwik, RIM-N, Gonobio-Test, Minitek, Gonochek II, GonoGen, Phadebact Monoclonal GC OMNI Test, and Syva MicroTrak Test. J. Clin. Microbiol. 26: 493–497.
8. Dolter, J., L. Bryant, and J. M. Janda. 1990. Evaluation of five rapid systems for the identification of *Neisseria gonorrhoeae*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 13: 265–267.
9. European Community. Commission Decision No 2002/253/EC of 19 March 2002 laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Communities 3.4.2002. 86: 44–62.
10. Farhat, S. E., M. Thibault, and R. Devlin. 2001. Efficacy of a swab transport system in maintaining viability of *Neisseria gonorrhoeae* and *Streptococcus pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 39: 2958–2960.
11. Farrell, D. J. 1999. Evaluation of AMPLICOR *Neisseria gonorrhoeae* PCR using *cppB* nested PCR and *16S rRNA* PCR. J. Clin. Microbiol. 37: 386–390.
12. Faur, Y. C., M. H. Weisburd, M. E. Wilson, and P. S. May PS. 1973. A new medium for the isolation of pathogenic *Neisseria* (NYC medium). I. Formulation and comparisons with standard media. Health Lab. Sci. 10: 44–54.
13. Gaydos, C. A., T. C. Quinn, D. Willis, A. Weissfeld, E. W. Hook, D. H. Martin, D. V. Ferrero, and J. Schachter. 2003. Performance of the APTIMA Combo 2 assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in female urine and endocervical swab specimens. J. Clin. Microbiol. 41: 304–309.
14. Hjelmvoll, S. O., M. E. Olsen, J. U. Sollid, H. Haaheim, M. Unemo, and V. Skogen. 2006. A fast real-time polymerase chain reaction method for sensitive and specific detection of the *Neisseria gonorrhoeae porA* pseudogene. J. Mol. Diagn. 8: 574–581.
15. Hook, E. W., and H. H. Handsfield. 1999. Gonococcal infections in the adult, p. 451–466. In K. K. Holmes, P. A. Merdh, P. F. Sparling, S. M. Lemon, W. E. Stamm, P. Piot, and J. Wasserheit (ed.), Sexually Transmitted Diseases, 3<sup>rd</sup> ed. McGraw Hill Book Co., New York, N.Y.
16. Janda W. M., and J. S. Knapp. 2003. *Neisseria* and *Moraxella catarhalis*, p. 585–608. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al., (eds.). Manual of clinical microbiology, 8th ed., vol. 1. ASM Press, Washington, D.C., USA.
17. Kellogg, J. A., and L. K. Orwig. 1995. Comparison of GonoGen, GonoGen II, and MicroTrak direct fluorescent-antibody test with carbohydrate fermentation for confirmation of culture isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Clin. Microbiol. 33: 474–476.
18. Kellogg Jr, D. S., and E. M. Turner. 1973. Rapid fermentation confirmation of *Neisseria gonorrhoeae*. Appl. Microbiol. 25: 550–552.
19. Laird, R. C., and M. T. Kelly. 1985. Evaluation of a one-hour test for the identification of *Neisseria* species. J. Clin. Microbiol. 22: 238–240.

20. Lawton, W. D., and G. J. Battaglioli. 1983. Gono Gen coagglutination test for confirmation of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Clin. Microbiol. 18: 1264–1265.
21. Little, M. C., J. Andrews, R. Moore, S. Bustos, L. Jones, C. Embres, G. Durmowicz, J. Harris, D. Berger, K. Yanson, C. Rostkowski, D. Yursis, J. Price, T. Fort, A. Walters, M. Collis, O. Llorin, J. Wood, F. Failing, C. O'Keefe, B. Scrivens, B. Pope, T. Hansen, K. Marino, K. Williams, and M. Boenisch. 1999. Strand displacement amplification and homogeneous real-time detection incorporated in a second-generation DNA probe system, BDProbeTecET. Clin. Chem. 45: 777–784.
22. Mahony, J., S. Chong, D. Jang, K. Luinstra, M. Faught, D. Dalby, J. Sellors, and M. Chernesky. 1998. Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription-mediated amplification: identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. J. Clin. Microbiol. 36: 3122–3126.
23. Mahony, J. B., X. Song, S. Chong, M. Faught, T. Salonga, and J. Kapala. 2001. Evaluation of the NucliSens Basic Kit for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in genital tract specimens using nucleic acid sequence-based amplification of 16S rRNA. J. Clin. Microbiol. 39: 1429–1435.
24. Martin, D. H., C. Cammarata, B. Van Der Pol, R. B. Jones, T. C. Quinn, C. A. Gaydos, K. Crotchfelt, J. Schachter, J. Moncada, D. Jungkind, B. Turner, and C. Peyton. 2000. Multicenter evaluation of AMPLICOR and automated COBAS AMPLICOR CT/NG tests for *Neisseria gonorrhoeae*. J. Clin. Microbiol. 38:3544–3549.
25. Martin, J. E., J. H. Armstrong, and P. B. Smith. 1974. New system for cultivation of *Neisseria gonorrhoeae*. Appl. Microbiol. 27: 802–805.
26. Mirrett, S., L. B. Reller, and J. S. Knapp. 1981. *Neisseria gonorrhoeae* strains inhibited by vancomycin in selective media and correlation with auxotype. J. Clin. Microbiol. 14: 94–99.
27. Modarress, K. J., A. P. Cullen, W. J. Jaffurs Sr., G. L. Troutman, N. Mousavi, R. A. Hubbard, S. Henderson, and A. T. Lurincz. 1999. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in swab specimens by the Hybrid Capture II and PACE 2 nucleic acid probe tests. Sex. Transm. Dis. 26: 303–308.
28. Morello J. A., W. M. Janda, and G. V. Doern. 1991. *Neisseria* and *Branhamella*. In: Balows A et al., eds. Manual of clinical microbiology, 5th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 258–276.
29. Morse, S. A., and L. Bartenstein. 1976. Adaptation of the Minitest system for the rapid identification of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Clin. Microbiol. 3: 8–13.
30. Palmer, H. M., H. Mallinson, R. L. Wood, and A. J. Herring. 2003. Evaluation of the specificities of five DNA amplification methods for the detection of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Clin. Microbiol. 41: 835–837.
31. Panke, E. S., L. I. Yang, P. A. Leist, P. Magevney, R. J. Fry, and R. F. Lee. 1991. Comparison of Gen-Probe DNA probe test and culture for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in endocervical specimens. J. Clin. Microbiol. 29: 883–888.
32. Philip, A., and G. C. Garton. 1985. Comparative evaluation of five commercial systems for the rapid identification of pathogenic *Neisseria* species. J. Clin. Microbiol. 22: 101–104.
33. Sparling, P. F., and H. H. Handsfield. 2000. *Neisseria gonorrhoeae*, p. 2242–2258. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed. Churchill Livingstone, Inc., Philadelphia, Pa.
34. Thayer, J. D., and J. E. Martin Jr. 1966. Improved medium selective for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. Public Health Rep. 81:559–562.
35. Unemo, M., O. Norlun, and H. Fredlund. 2005. The *porA* pseudogene of *Neisseria gonorrhoeae* — low level of genetic polymorphism and a few, mainly identical, inactivating mutations. APMIS. 113: 410–419.
36. Unemo, M., H. M. Palmer, T. Blackmore, G. Herrera, H. Fredlund, A. Linnios, N. Nguyen, and J. Tapsall. 2006. Global transmission of prolyliminopeptidase (PIP)-negative *Neisseria gonorrhoeae* strains — implications for changes in diagnostic strategies? Sex. Transm. Infect. 83: 47–51.
37. Unemo, M., A. Savicheva, O. Budilovskaya, E. Sokolovsky, M. Larsson, and M. Domeika. 2006. Laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* in St Petersburg, Russia: inventory, performance characteristics and recommended optimisations. Sex. Transm. Infect. 82: 41–44.
38. van der Pol, B., D. H. Martin, J. Schachter, T. C. Quinn, C. A. Gaydos, R. B. Jones, K. Crotchfelt, J. Moncada, D. Jungkind, B. Turner, C. Peyton, J. F. Kelly, J. B. Weiss, and M. Rosenstrauss. 2001. Enhancing the specificity of the COBAS AMPLICOR CT/NG test for *Neisseria gonorrhoeae* by retesting specimens with equivocal results. J. Clin. Microbiol. 39: 3092–3098.
39. Van Dyck, E., A. Z. Meheus, and P. Piot. Gonorrhoea. In: Laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases. World Health Organization (WHO), Geneva; 1999: 1–21.
40. Whiley, D. M., P. P. Buda, K. Freeman, N. I. Pattle, J. Bates, and T. P. Sloots. 2005. A real-time PCR assay for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in genital and extragenital specimens. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 52: 1–5.
41. Whiley, D. M., J. W. Tapsall, and T. P. Sloots. 2006. Nucleic acid amplification testing for *Neisseria gonorrhoeae*: an ongoing challenge. J. Mol. Diagn. 8: 3–15.
42. Yong, D. C., and A. Prytula. 1978. Rapid micro-carbohydrate test for confirmation of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Clin. Microbiol. 8: 643–647.
43. Young, H. 1978. Cultural diagnosis of gonorrhoea with modified New York City (MNYC) medium. Br. J. Vener. Dis. 54: 36–40.
44. Young, H., and A. Moyes. 1996. An evaluation of pre-poured selective media for the isolation of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Med. Microbiol. 44: 253–260.

\* Настоящие методические рекомендации разработаны в сотрудничестве с диагностической группой по ИППП Международной сети специалистов по сексуальному и репродуктивному здоровью и правам (СРЗП; Eastern European Network for Sexual and Reproductive Health, EE SRH). СРЗП сеть является проектом, поддерживаемым Шведским агентством международного развития и кооперации (SIDA). Руководитель проекта — проф. Марюс Домейка, Упсальский университет, Восточноевропейский комитет Шведского общества охраны здоровья.