



П.В. Федорич, С.Б. Зелений,
А.С. Зайцева, О.В. Мазій

Українська військово-медична академія, Київ

Визначення деяких найпростіших у хворих з урогенітальними інфекціями методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі

Ключові слова

Урогенітальні інфекції, метод полімеразної ланцюгової реакції, найпростіші.

Трихомоноз — захворювання сечостатевої системи, спричинене найпростішим одноклітинним паразитом *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*) [1]. Захворювання передається статевим шляхом, але в окремих випадках зараження може відбуватися через контаміновані поверхні. Трихомоноз щороку діагностують приблизно в 170 млн випадків [11]. Ця хвороба не має сезонного характеру, уражує населення усіх верств. Багато дослідників стверджують, що захворюваність на трихомоноз чоловіків і жінок приблизно однакова і становить близько 10 % серед дорослого населення [5]. Серед осіб, що звертаються до спеціалізованих дерматовенерологічних закладів з приводу інфекцій, що передаються переважно статевим шляхом (ІПСШ), *T. vaginalis* виявляють приблизно в 40 % випадків [10].

T. vaginalis в переважній більшості клінічних випадків є причиною специфічного запалення різних відділів сечостатевої системи людини. Проте можливі варіанти бактеріоносійства, зокрема й транзитного. Поширення *T. vaginalis* в організмі господаря відбувається висхідним шляхом, а також лімфогенно [9].

Патогенність *T. vaginalis* для людини не обмежується тільки специфічним запаленням, вона має різні вияви. Так, доведено роль цього збудника у формуванні патогенних мікробіоценозів, у тому числі й бактеріального вагінозу (БВ) у жінок, зниженні імунітету, сприянні в розвитку гіперпластичних процесів в органах сечостатевої системи як жінок, так і чоловіків [7, 15, 18]. Особливої уваги, на наш погляд, заслуговує здатність

T. vaginalis до захоплення та резервування різних патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів унаслідок їх неповного фагоцитозу (резервуарна або «танк»-функція) [2, 19]. Це може зумовлювати тривалу персистенцію різних бактерій, вірусів або грибків і дає пояснення невдалих спроб елімінації вказаних мікроорганізмів з організму хворого в разі застосування специфічних лікувальних підходів [11].

Згідно із систематикою, *Trichomonas vaginalis* належить до типу найпростіших — *Protozoa*, класу джгутикових — *Flagella*, сімейства — *Trichomonadidae*, роду — *Trichomonas* [6]. Людина може бути носієм трьох видів трихомонад: *Trichomonas tenax* (*elongata*), *Trichomonas hominis* (*abdominalis*), *Trichomonas vaginalis*. У ротовій порожнині в уражених карієсом зубів мешкає *Trichomonas tenax*. *Trichomonas hominis* — коменсал товстої кишки. Трихомонадою, що здатна жити в сечостатевому каналі, вважається винятково *T. vaginalis* [13]. Інші трихомонади людини, які виявляють у сечостатевому каналі лабораторно, сьогодні розглядають як контамінацію під час забору матеріалу. Вважається, що *Trichomonas tenax* і *Trichomonas hominis* не можуть прижитися в сечостатевій системі людини, а *T. vaginalis* — ротовій порожнині і прямій кишці. Тому оральний і анальний секс в сучасних умовах не розглядають як потенційну можливість інфікування трихомонадами [4].

Незважаючи на інтенсивне вивчення проблеми, до сьогодні діагностика трихомонозу супроводжується певними труднощами. Відомо, що, окрім типової форми *T. vaginalis*, існують

атипові — так звані амебоїдні, або тканинні. Їх виникнення пов'язують зазвичай з наслідками застосування різних медикаментозних препаратів як місцевої, так і загальної дії [11]. Атипові форми *T. vaginalis* є достатньо проблематичними для діагностування, зокрема в разі використання методики оптичної мікроскопії мазків — на сьогодні найпоширенішої у світі методики виявлення патогена, що пов'язано з широкою варіабельністю форми та розмірів цього збудника, а також наявністю джгутиків і ядер. Крім того, атипові форми *T. vaginalis* мають певну зовнішню подібність з іншими представниками найпростіших [12], зокрема з *Trichomonas tenax* і *Trichomonas hominis* (рисунок).

У процесі поглибленого вивчення різних методів діагностики трихомонозу, які застосовують на сучасному етапі, встановлено розбіжності в ідентифікації збудника. Так, результати одночасно використаних оптичної мікроскопії і полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для дослідження біологічного матеріалу одних і тих самих пацієнтів істотно різнилися. Причому, всупереч нашим очікуванням, методика оптичної мікроскопії виявилася результативнішою за ПЛР. Зважаючи на більшу специфічність і чутливість ПЛР, було зроблено припущення щодо існування в сечостатевої системі людини, окрім *T. vaginalis*, інших найпростіших. Таку думку останніми десятиліттями періодично висловлювали профільні фахівці різних країн, проте виявити *Trichomonas tenax* чи *Trichomonas hominis* в сечостатевої системі людини не вдалося [13, 16].

За останніх кілька десятиліть істотно змінилися умови життєдіяльності людини, а також стереотип сексуальної поведінки, зокрема стала ширшою практика орального та анального сексу [17]. Водночас змінилася патогенність певних мікроорганізмів, що можуть мешкати в сечостатевої системі людини (мікоплазми, гарднерели).

Деякі найпростіші, на нашу думку, також могли зазнати певного патоморфозу і набути здатності колонізувати сечостатеву систему людини.

З огляду на викладене вище доцільним є ретельніше вивчення представників типу найпростіших з точки зору їхньої можливості колонізувати сечостатеву систему людини та набувати патогенності. На нашу думку, такі властивості мають найпростіші, які потрапляють у сечостатеву систему під час незахищеного бар'єрними засобами орального й анального сексу, що значно поширені в інтимних стосунках наших сучасників [17]. Вивчивши відповідні дані літератури, ми зробили припущення, що найбільша вірогідність набуття згаданих вище якостей у таких представників типу найпростіших: *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba gingivalis*. Для ідентифікації цих мікроорганізмів було обрано метод ПЛР у реальному часі як найбільш специфічну і чутливу з доступних на сьогодні діагностичних методик [8].

Мета дослідження — визначити деякі найпростіші (*Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba gingivalis*) у пацієнтів з уrogenітальними інфекціями методом ПЛР у реальному часі.

Матеріали та методи

Було обстежено 45 пацієнтів, що звернулися до спеціалізованих дерматовенерологічних закладів для обстеження на уrogenітальні інфекції. Крім обстеження на наявність класичних венеричних хвороб та збудників інших ППСШ, зокрема і *T. vaginalis*, усім пацієнтам додатково проведено спеціальне дослідження секрету сечостатевої системи, спрямоване на виявлення *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba gingivalis*. Для чистоти експерименту до дослідної групи було відібрано тільки тих пацієнтів, у яких за допомогою методу ПЛР виключено можливість інфікування на *T. vaginalis*.

До дослідної групи увійшли пацієнти обох статей, зокрема 24 (53 %) жінки та 21 (47 %) чоловік віком від 20 до 49 років (в середньому $31 \pm 1,5$ року). В усіх обстежених встановлено хронічний перебіг уrogenітальних інфекцій.

Метод полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі використано як найбільш специфічний і чутливий на сучасному етапі [3, 14]. Забір біологічного матеріалу для дослідження на наявність уrogenітальних інфекцій виконано відповідно до чинних документів [8]. У чоловіків брали зскрібки із сечівника одноразовими зондами типу «ЗГУ — ЦМ» виробництва Російської Федерації та робили забір секрету перед-

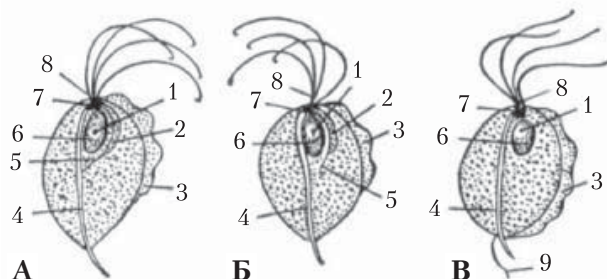


Рисунок. Трихомонади: *T. vaginalis* (А), *T. tenax* (Б); *T. hominis* (В): 1 — ядерце; 2 — парабазальний апарат; 3 — ундулююча мембрана; 4 — аксостиль; 5 — парабазальна нитка; 6 — ядро; 7 — блефаропласт; 8 — передні джгутики; 9 — кінцевий джгутик

міхурової залози після її пальцевого масажу. В жінок виконували забір піхвових виділень, зскрібків та/або виділень із сечівника та цервікального каналу, також одноразовими зондами. Дослідні зразки після реєстрації розміщували у пробірках «Еппендорф», що містили 1 мл стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду, і зберігали в замороженому вигляді до проведення відповідного дослідження.

Праймери для виявлення нуклеїнових кислот *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* та *Entamoeba gingivalis* підбирали за допомогою програми Vector NTI. Використовували послідовності нуклеїнових кислот відповідних видів, отриманих з бази даних GenBank (NCBI) [20]. Мінімальна довжина праймерів становила 24 залишки нуклеотидів. На 3'-кінці праймери містили гуаніновий або цитозиновий нуклеотид. Кількість GC пар у праймерах задавали таким чином, щоб температура випалу була однаковою для двох праймерів пари і лишалася в межах від 59 до 64 °С. Для перевірки унікальності праймерів використовували онлайн програму BLAST (NCBI) [21]. Для теоретичної перевірки продуктів ПЛР за допомогою підібраних праймерів використовували онлайн пакет програм Bioinformatics tools (база даних Університету м. Берклі, США [22].

Результати та обговорення

В жодному випадку в обстежених пацієнтів під час попередньої ПЛР не виявлено *T. vaginalis*. У 5 пацієнтів за результатами світлової мікроскопії мазків, забарвлених за методом Романовського, виявлено атипичні форми трихомонад.

Trichomonas tenax виявлено у 13 (29 %) пацієнтів, *Trichomonas hominis* не ідентифіковано в жодного, *Giardia lamblia* — у 2 (4,4 %), *Entamoeba histolytica* не виявлено, *Entamoeba gingivalis* — у 2 (4,4 %). В одній пацієнтки одночасно встановлено два з досліджуваних мікроорганізмів — *Giardia lamblia* та *Entamoeba gingivalis*.

Привертає увагу той факт, що більшість випадків виявлення *Trichomonas tenax* становили жінки (77 %). *Giardia lamblia* та *Entamoeba gingivalis* ідентифіковано в рівних гендерних співвідношеннях, однак через незначну кількість виявлень немає підстав робити остаточний висновок щодо превалювання зазначених мікроорганізмів залежно від статі пацієнтів.

Таким чином, за допомогою методу ПЛР у реальному часі встановлено можливість існування деяких найпростіших (*Trichomonas tenax*, *Giardia*

lamblia, *Entamoeba gingivalis*) у сечостатевої системі людини. Потрібно зазначити, що, згідно з проведеним нами оглядом спеціальної літератури з відповідного питання, спроби виявлення *Trichomonas tenax* у сечостатевої системі людини були безрезультатними [13, 16]. Таким чином, можливість існування *Trichomonas tenax* в сечостатевої системі людини показано вперше.

Унаслідок певного патоморфозу мікроорганізми, зокрема *Trichomonas tenax*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba gingivalis*, набули здатності колонізувати сечостатеву систему людини.

Відповіддю на цілком природне запитання лікарів-клініцистів «У чому полягає патогенність *Trichomonas tenax*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba gingivalis* для сечостатевої системи людини?» може бути наше власне припущення щодо існування так званої резервуарної функції за аналогією з *T. vaginalis* у зазначених мікроорганізмів, зокрема у *Trichomonas tenax*. Визначення можливості безпосередньої патогенної дії цих мікроорганізмів на сечостатеву систему людини потребує подальшого глибокого та всебічного вивчення.

Окремо слід зазначити, що виявлення *Trichomonas tenax*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba gingivalis* — мікрофлори ротової порожнини та кишечнику в сечостатевої системі людини, на наш погляд, яскраво демонструє збільшення в сучасних умовах значення анального та, особливо, орального сексу у виникненні запальних процесів сечостатевого каналу.

Висновки

За допомогою методу ПЛР у реальному часі під час дослідження секрету сечостатевої системи показано можливість існування деяких найпростіших в сечостатевої системі людини. *Trichomonas tenax* ідентифіковано у 13 (29 %) пацієнтів, *Giardia lamblia* — у 2 (4,4 %), *Entamoeba gingivalis* — у 2 (4,4 %), *Trichomonas hominis* та *Entamoeba histolytica* не виявлено в жодного з учасників дослідження.

Висловлено припущення щодо набуття деякими найпростішими мікроорганізмами здатності колонізувати сечостатеву систему внаслідок певного патоморфозу, пов'язаного зі зміною стереотипу сексуальної поведінки сучасної людини з розширенням практики орального та анального сексу.

Висловлено припущення щодо існування так званої резервуарної функції у досліджуваних найпростіших, зокрема у *Trichomonas tenax*, що може зумовлювати їхню патогенність для сечостатевої системи людини.

Список літератури

1. Адашкевич В.П. Инфекции, передаваемые половым путем / В.П. Адашкевич.— М.: Медицинская книга, 2006.— 425 с.
2. Бакшеев С.Н. *Trichomonas urogenitalis*. TANK-функция. Асимптомное носительство и проблемы терапии / С.Н. Бакшеев, С.Л. Неймарк // Вестн. Рос. гос. университета.— 2001.— № 2.— С. 17.
3. Ворошилина Е.С. Биоценоз влагалища с точки зрения количественной ПЦР: что есть норма? / Е.С. Ворошилина, Л.В. Тумбинская, А.Е. Донников, Е.Э. Плотнок, Л.В. Хаютин // Акушерство и гинекология.— 2011.— № 1.— С. 57—65.
4. Гуцин А.Е. Молекулярно-генетическое исследование клинического материала с использованием праймеров к различным участкам генома *Trichomonas Vaginalis* и различным видам царства Protozoa. Том III. Раздел 14. Инфекции органов репродукции / А.Е. Гуцин, П.Г. Рыжих, Л.А. Березина, Л.Б. Куляшова, Н.С. Махлай — М.: Молекулярная диагностика, 2010.— С. 204—207.
5. Дерматологія, венерологія: підручник / За ред. В.І. Степаненка.— К.: Д 36 КІМ, 2012.— 848 с., 253 іл.
6. Коротяев А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед. вузов. 4-е изд., испр. и доп. / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев.— СПб: СпецЛит, 2008.— 660 с.
7. Липова Е.В. Урогенитальные инфекции, обусловленные условно-патогенной биотой, у женщин репродуктивного возраста (клинико-лабораторная диагностика): учебное пособие. Утверждено РМАПО / Е.В. Липова, М.Н. Болдырева, Б.Ю. Трофимов, Ю.Г. Витвицкая.— М., 2009.— 46 с.
8. Мавров Г.І. Уніфікація лабораторних методів дослідження в діагностиці захворювань, що передаються статевим шляхом / Г.І. Мавров, О.П. Белозоров, Л.С. Тацька.— Х.: Факт, 2000.— 120 с.
9. Мавров Г.І. Трихомоноз беременных и новорожденных. Часть 2 / Г.І. Мавров, Т.В. Осинская // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол.— 2010.— № 2 (37).— С. 113—120.
10. Рыжих П.Г. Определение и сравнительный анализ пределов детекции микроскопии нативного и окрашенного препаратов, ПЦР, НАСБА для выявления *T. vaginalis*. Том III. Раздел 14. Инфекции органов репродукции / П.Г. Рыжих, А.Е. Гуцин, Г.А. Шипулин.— М.: Молекулярная диагностика, 2010.— С. 241—244.
11. Степаненко В.І. Урогенітальні інфекції: трихомоніаз, кандидоз, генітальний герпес / В.І. Степаненко, Т.С. Ковалова.— К.: КІМ, 2008.— 288 с.
12. Туркевич О.Ю. Деякі питання етіопатогенетичного обґрунтування комплексного лікування бактеріального вагінозу / О.Ю. Туркевич // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол.— К., 2010.— № 1 (36).— С. 92—96.
13. Adu-Sarkodie Y. Lack of evidence for the involvement of rectal and oral trichomonads in the aetiology of vaginal trichomoniasis in Ghana / Adu-Sarkodie Y., Opoku B.K., Crucitti T. et al. // Sex. Transm. Infect.— 2007.— Vol. 83.— P. 130—132.
14. Ali Ei Kamel. Pulmonary eosinophilia due to *Trichomonas tenax* / Ali Ei Kamel, Naceur Rouetbi, Mohamed Chakroun, Mohamed Battikh // Thorax.— 1996.— Vol. 51.— P. 554—555.
15. Juliano C. In vitro phagocytic interaction between *Trichomonas vaginalis* isolates and bacteria / Juliano C., Cappuccinelli P., Mattana A. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.— 1991.— Vol. 10 (6).— P. 497—502.
16. Hassan Mallat. Molecular Characterization of *Trichomonas tenax* Causing Pulmonary Infection / Hassan Mallat, Isabelle Podglajen, Veronique Lavarde, Jean-Luc Mainardi, Muriel Cornet // J. Clin. Microbiol.— 2004.— Vol. 42, N 8.— P. 3886—3887.
17. Leichter J.S., Chandra A., Liddon N. et al. Prevalence and correlates of heterosexual anal and oral sex in adolescents and adults in the United States // J. Infect. Dis.— 2007.— Vol. 15, N 196 (12).— P. 1852—1859.
18. Schwebke J.R. Trichomoniasis / Schwebke J.R., Burgess D. // Clin. Microbiol. Reviews.— 2004.— Vol. 17 (4).— P. 794—803.
19. Szreter H. Phagocytosis of *Streptococcus faecalis* by *Trichomonas vaginalis*. Electron microscopy studies / Szreter H., Kassner J., Michalczak J. // Wlad. Parazytol.— 1987.— Vol. 33.— P. 643—647 (In Polish.).
20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
21. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.
22. www.ucsc.edu.

П.В. Федорич, С.Б. Зеленый, А.С. Зайцева, О.В. Мазий

Определение некоторых простейших у больных с урогенитальными инфекциями методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

Работа посвящена определению некоторых простейших (*Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba gingivalis*) у пациентов с урогенитальными инфекциями методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Показана возможность существования отдельных простейших в мочеполовой системе человека. *Trichomonas tenax* идентифицированы у 13 (29 %) пациентов, *Giardia lamblia* — у 2 (4,4 %), *Entamoeba gingivalis* — у 2 (4,4 %). Высказано предположение относительно приобретения некоторыми простейшими способности колонизировать мочеполовую систему в результате определенного патоморфоза, связанного со сменой стереотипа сексуального поведения современного человека с расширением практики орального и анального секса.

P.V. Fedorych, S.B. Zeleniy, L.S. Zaytseva, O.V. Maziy

Determination of some protozoans in patients with urogenital infections by polymerase chain reaction in real time

The paper defines some protozoans (*Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba gingivalis*) in patients with urogenital infections by real-time polymerase chain reaction. The possibility of existence of some protozoans in the urogenital system of man is shown. *Trichomonas tenax* was found in 13 (29 %) patients, *Giardia lamblia* – in 2 (4.4 %) persons, *Entamoeba gingivalis* – in 2 (4.4 %) people. Supposition is expressed about the acquisition by some protozoans the ability to colonize the urogenital system as a result of certain pathomorphism associated with the change of the stereotype of sexual behavior of modern man and spread of practice of oral and anal sex.