

Современные тенденции в диагностике вульвовагинального кандидоза

Л.М.Дьяков¹, А.В.Ходяков², А.Г.Зуева¹,
А.С.Коновалов¹

¹Российский университет дружбы народов,
Москва

²ООО «НекстБио», Москва

В статье представлен обзор мультиплексного ПЦР теста, разработанного для лабораторной диагностики вульвовагинального кандидоза. Тест позволяет выявить и определить количественно пять наиболее распространенных возбудителей кандидоза: *Candida albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*. Определены первичные характеристики набора. Предел обнаружения составил 50 ГЭ (геномных эквивалентов)/мл, линейный диапазон 1×10^2 – 1×10^7 ГЭ/мл ($0,98 \leq R \leq 1,0$) для каждого из определяемых видов *Candida*.

Ключевые слова: вульвовагинальный кандидоз, диагностика, ПЦР, *Candida*.

Contemporary Trends in Diagnostic of Vulvovaginal Candidiasis

L.M.D'yakov¹, A.V.Khodyakov², A.G.Zueva¹,
A.S.Konovalev¹

¹RUDN University, Moscow

²NextBio Ltd., Co., Moscow

The article presents the multiplex PCR assay review, developed for laboratory diagnostic of vulvovaginal candidiasis. The assay designed for identification and quantitation of five most prevalent species of candidiasis: *Candida albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*. The primary analytical characteristics of assay were determined. The limit of detection was 50 GE (genome equivalent)/ml, linear range 1×10^2 – 1×10^7 GE/ml ($0,98 \leq R \leq 1,0$) for each species.

Keywords: vulvovaginal candidiasis, diagnostics, PCR, *Candida*.

Второй по частоте встречаемости причиной, после бактериального вагиноза (БВ), обращения женщин за медицинской помощью в сфере гинекологии является вульвовагинальный кандидоз (ВВК). По данным различных исследователей у 70–80% женщин репродуктивного возраста в течение указанного периода жизни отмечен минимум один случай ВВК. У половины из них проявляются повторные случаи заболевания, из которых у примерно 8% ВВК переходит в хроническую рецидивирующую форму ВВК [1]. Несмотря на наиболее часто выявляемого возбудителя ВВК – *Candida albicans*, в последнее время отмечается увеличение частоты рецидивирующих и хронических форм ВВК, вызванных другими вида-

ми *Candida* (т. н. *non-albicans*) [2]. Важным моментом в диагностике ВВК является условная патогенность микроорганизма. В 20% случаев обнаружено наличие *Candida* в отделяемом влагалища у женщин без проявления симптомов заболевания [3]. Таким образом, диагностика подразумевает не только обнаружение, но и количественный обсчет микроорганизмов.

Факторы, предрасполагающие к ВВК, можно разделить на внутренние и внешние. К первой категории причин можно отнести внутренние проблемы организма; нарушение функции эндокринной системы, заболевания желудочно-кишечного тракта, иммунодефицит, факторы окружающей среды. Ко второй категории факторов относятся прием медикаментов, влияющих на биоценоз влагалища, факторы внешней среды [4]. Так длительное применение антибиотиков, бесконтрольный прием антимикотиков, с неправильно подобранной дозировкой, усугубляет течение ВВК, и приводит к увеличению количества минорных видов *Candida*, устойчивых к антимикотикам [2].

Освещение проблем заболеваний, передающихся половым путем, кроме положительного предостерегающего просвещения, несет и некоторые отрицательные моменты. Реклама и широкое распространение препаратов для лечения интимных заболеваний, привело к тому что заболевания сами назначают себе курс лечения, исходя из симптомов заболевания либо из каких иных соображений. Однако, по современным данным, ни один из наиболее частых симптомов вульвовагинальных расстройств (выделение, жжение, и т.д.) не является патогномичным. Так, по данным D.Ferris и соавт. среди женщин, которые сами себе диагностировали ВВК, реальных случаев с ВВК было лишь 33,7%, 18,9% – БВ, 21,1% – смешанные инфекции, 13,7% – без инфекций, 10,5% – иные причины, 2,1% – трихомониаз [5]. Это приводит к тому, что женщины не получают адекватного лечения, увеличивается время до диагностики (что может привести к хронической инфекции), несут финансовые убытки покупая ненужные препараты.

С другой стороны, в современном мире для многих женщин работоспособного возраста, бывает достаточно трудно выделить время для посещения клиники. Посещение врача и ожидание результатов анализа методом культуральной диагностики, считаемой «золотым стандартом», может затянуться на неделю. Развитие современных методов диагностики направленно не только на увеличение точности, но и на уменьшение времени диагностики. Метод ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) является одним из направлений такого развития. ПЦР-РВ настоящее время часто можно видеть в облики небольших устройств для так называемой «point-of-care» (РОС) диагностики, и что характерно подобные устройства почти не требуют специального лабораторного оснащения и могут быть установлены даже в жилых помещениях [6]. РОС-устройства для урогенитальных инфекций позволяют детектировать инфекционные или иные агенты непосредственно из образца биоматериала, выделение нуклеиновой кислоты и дальнейшая амплификация проходят внутри одноразового картриджа. Например, существующее в настоящее время РОС-устройство от компании Serheid позволяет детектировать некоторые урогенитальные инфекции за 90 мин. Однако для РОС-устройств стоимость одного анализа пока остается довольно высокой.

Недавно R.Varnes и соавт. провели работу, в которой сравнивали данные, полученные из анализа влагалищных мазков, полученных в клинике, и маз-

ков, выполненных самостоятельно пациентками на предмет диагностики ВВК либо БВ. Было показано что чувствительность и специфичность метода анализа с образцов, полученных пациентками самостоятельно (95,5% и 88,5%, соответственно), вполне высоки для валидной диагностики методом ПЦР. В то же время, диагностика по клиническим признакам обладала недостаточной чувствительностью и специфичностью для дифференцировки ВВК и БВ [7]. Очевидно, данный подход по применению самостоятельного забора материала для клинического анализа уменьшит в целом время пребывания в клинике.

Однако в настоящее время основным методом лабораторной диагностики ВВК является микроскопия окрашенного препарата и культуральное исследование – посев на среду Сабуро. Микроскопия окрашенного препарата позволяет получить результаты исследования в короткие сроки и дает возможность обнаруживать вегетирующую форму грибов – псевдомицелий, а также дополнительные диагностические признаки развития инвазии. Недостатками метода являются субъективность и возможные ошибки при интерпретации результата, невозможность видовой идентификации, а также низкая диагностическая чувствительность – 30–40% [8]. Для повышения чувствительности и специфичности исследования препарат перед микроскопией обрабатывают 10–30% раствором КОН, в этом случае псевдомицелий и бластоспоры приобретают большую контрастность, чувствительность метода при манифестных формах кандидоза увеличивается до 60–80% [9]. Но стоит учитывать, что обработка КОН позволяет увеличивать чувствительность исследования только при микроскопии нативного препарата, которая в России практически не используется. Кроме того, стоит учитывать, что большинство non-albicans видов не образуют псевдомицелий, поэтому их идентификация при микроскопии может быть затруднена. Видовая идентификация *Candida* при микроскопии невозможна. Микроскопия биоматериала показана в случаях, когда у пациентов имеются симптомы и клинические проявления инфекционно-воспалительного процесса в качестве наиболее быстрого метода этиологической диагностики. Исследование позволяет наряду с выявлением клеток дрожжеподобных грибов обнаружить лабораторные признаки воспаления [10].

Посев образца на плотные питательные среды используют для выделения культуры грибов рода *Candida*. Исследование позволяет определить вид гриба, провести количественную оценку степени обсемененности слизистой и определение чувствительности к антимикотикам. Процедура культивирования может занимать до 7 сут. Диагностическая чувствительность теста достигает 90–95% [11]. Чаще всего исследование выполняется после получения результатов микроскопии, что еще больше удлинит процесс постановки диагноза. Учитывая, что ВВК – остро протекающее заболевание (в большинстве случаев), скорость постановки диагноза является ключевым критерием при выборе метода диагностики. Длительность культуральных исследований и высокая стоимость ограничивают применение данного метода отдельными клиническими случаями. Кроме того, на эффективность метода влияют условия транспортировки биологического материала и сохранение жизнеспособности возбудителя. Культуральные исследования рекомендуется проводить при рецидивирующих формах инфекционно-воспалительных процессов, когда *Candida* не обнаружи-

ваются микроскопически, и исключены другие потенциальные возбудители патологического процесса (трихомонады и другие возбудители урогенитальных инфекций, возбудители аэробного вагинита) [12]. Определение степени обсемененности повышает информативность исследования. При возникновении рецидива воспалительного процесса на фоне проведенной антимикотической терапии необходимо провести культуральные исследования с видовой идентификацией и определением чувствительности к антимикотическим препаратам [13].

Для выявления ДНК *C. albicans* и других видов *Candida* в РФ используют метод ПЦР с различными вариантами детекции продуктов реакции. Многие из серийно выпускаемых наборов реагентов направлены на выявление ДНК *C. albicans* без количественной оценки, что ограничивает применение метода. Поскольку грибы рода *Candida* относятся к сапрофитам и могут в низкой концентрации присутствовать на поверхности кожи и слизистых оболочек, то использование для диагностики только обнаружение ДНК (ПЦР, качественное определение) недостаточно информативно. С другой стороны, существуют наборы реагентов для количественной оценки *Candida* spp. Такой подход также нельзя назвать оптимальным, так как виды *Candida*, не имеющие отношения к развитию ВВК, широко распространены в природе (обнаруживаются в почве, воде, на коже человека и животных), а потому возможно получение «ложноположительных» результатов исследования и некорректное назначение антимикотических препаратов. Таким образом, наиболее целесообразным кажется следующий подход: определение концентрации ДНК *Candida* видов *albicans* и распространенных non-albicans (*C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*). Такой подход позволит определять степень обсемененности и может использоваться при рецидивирующих формах инфекционно-воспалительного процесса для установления его этиологии в комплексной диагностике, а также может использоваться для выбора тактики лечения, так как профиль чувствительности к антимикотикам установлен для отдельных видов *Candida* [14].

С учетом вышеописанного, в рамках реализации комплексного проекта при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации/Минобрнауки России по договору №03.G25.31.0226 от 03.03.2017 г. было разработано медицинское изделие «Набор реагентов для количественного определения ДНК возбудителей вульвовагинального кандидоза методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» (АмплиПрайм® VC)» и проведены предварительные и приемочные испытания набора.

Одной из особенностей набора реагентов «АмплиПрайм® VC» является возможность идентифицировать не только *C. albicans*, наиболее распространенный и патогенный вид *Candida*, но одновременно и другие виды, такие как *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis*. Определение минорных видов особенно важно при рецидивирующем ВВК, поскольку некоторые из них могут обладать резистентностью к известным антимикотикам. Например, *C. krusei* резистентны а *C. glabrata* проявляют дозозависимую чувствительность к препаратам азолового ряда [2]. Таким образом, несмотря на то, что ПЦР не позволяет напрямую определить чувствительность к антимикотическим препаратам, она позволяет определить те виды, присутствие которых требует изменения тактики терапии. Количественная оценка содержания микроорганизмов в биомате-

териале позволяет дифференцировать бессимптомное носительство и развитый кандидоз.

Характеристики набора, после проведенных первичных испытаний, включают в себя аналитическую специфичность, предел обнаружения, линейный диапазон. Аналитическая специфичность подтверждена отсутствием продуктов реакции при амплификации ДНК различных микроорганизмов и человека. При детекции каждого из указанных видов *Candida* было показано отсутствие межвидовой амплификации. Предел обнаружения для набора «АмплиПрайм® VC» составил 50 ГЭ/мл. Линейный диапазон $1 \times 10^2 - 1 \times 10^7$ ГЭ/мл для каждого из определяемых видов *Candida*, коэффициент корреляции для всех тестируемых концентраций укладывается в диапазон $0,98 \leq R \leq 1,0$. Для осуществления контроля эффективности выделения и отсутствия ингибирования реакции амплификации в наборе используется экзогенный внутренний контроль, который служит для предотвращения ложноотрицательных результатов и значительных отклонений количественных данных.

Выводы

Набор реагентов «АмплиПрайм® VC» предназначен для количественного определения ДНК возбудителей вульвовагинального кандидоза (грибов рода *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis*) в биологическом материале (отделяемое слизистой оболочки влагалища) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Данный набор позволяет в течении 3–4 ч получить диагностическую информацию с высоким уровнем достоверности.

Литература

- Sobel J.D., Faro S., Force R.W., Foxman B., Ledger W.J., Nyirjesy P.R. et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1998; 178 (2): 203–11.
- Анكيرская А.С. и соавт. Мониторинг видового состава и чувствительности дрожжеподобных грибов. *Клин микробиол антимикроб химиотер.* 2006; 8(1): 87–95. / Ankirskaya A.S. i soavt. Monitoring vidovogo sostava i chuvstvitel'nosti drozhzhopodobnykh gribov. *Klin mikrobiol antimikrob khimioter.* 2006; 8 (1): 87–95. [in Russian]
- Sobel J.D. Genital candidiasis. *Medicine.* 2014; 42: 364–8.
- Mills B.B. Vaginitis: Beyond the Basics. *Obstet Gynecol Clin N Am* 2017; 44: 159–177.
- Ferris D.G., Nyirjesy P., Sobel J.D., Soper D., Pavletic A., Litaker M.S. Over-the-counter antifungal drug misuse associated with patient-diagnosed vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol.* 2002 Mar; 99 (3): 419–25.
- Safavieh M., Coarsey C., Esiobu N., Memic A., Vyas J.M., Shafiee H., and Asghar W. Advances in *Candida* detection platforms for clinical and point-of-care applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2017 Jun; 37 (4): 441–58.
- Barnes P., Vieira R., Harwood J and Chauhan M. Self-taken vaginal swabs versus clinician-taken for detection of *candida* and bacterial vaginosis: a case-control study in primary care. *Br J Gen Pract.* 2017 Dec; 67 (665): e824–e829.
- Sherrard J., Donders G., White D., Jensen J.S.; European IUSTI. European (IUSTI/WHO) guideline on the management of vaginal discharge, 2011. *Int. J. STD AIDS.* 2011; 22 (8): 421–9.
- Bertholf M.E. Symptom diagnosis of *candida* vaginitis. *J. Fam. Pract.* 1983; 17 (5): 775–777.
- McClelland R.S., Richardson B.A., Hassan W.M., Graham S.M., Kiarie J., Baeten J.M. et al. Prospective study of vaginal bacterial flora and other risk factors for vulvovaginal candidiasis. *J. Infect. Dis.* 2009; 199 (12): 1883–90. doi: 10.1086/599213.
- Beigi R.H., Meyn L.A., Moore D.M., Krohn M.A., Hillier S.L. Vaginal yeast colonization in nonpregnant women: a longitudinal study. *Obstet. Gynecol.* 2004; 104 (5, Pt 1): 926–30.
- Geiger A.M., Foxman B., Sobel J.D. Chronic vulvovaginal candidiasis: characteristics of women with *Candida albicans*, *C. glabrata* and no *candida*. *Genitourin. Med.* 1995; 71 (5): 304–7.
- Thompson D.S., Carlisle P.L., Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot. Cell.* 2011; 10 (9): 1173–82. doi: 10.1128/EC.05085-11
- Румянцева Т.А., Савочкина Ю.А., Долгова Т.В., Зайцева С.В., Кахерская М. А., Кудрявцева Л.В., Гущин А.Е. Диагностика вульвовагинального кандидоза: сопоставление информативности клинических данных и результатов лабораторных исследований. *Акушерство и гинекология.* 2015; 3: 55–61. / Rumyantseva T.A., Savochkina Yu.A., Dolgova T.V., Zajceva S.V., Kakher-skaya M.A., Kudryavceva L.V., Gushchin A.E. Diagnostika vul'vovaginal'nogo kandidoza: sopostavlenie informativnosti klinicheskikh dannykh i rezul'tatov laboratornykh issledovaniy. *Akusherstvo i ginekologiya.* 2015; 3: 55–61. [in Russian]

Сведения об авторах:

Дьяков Леонид Максимович – инженер-лаборант, Российский университет дружбы народов, Москва

Ходяков Андрей Владимирович – генеральный директор ООО «НекстБио», Москва

Зуева Анна Григорьевна – аспирант кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и физиатрии, Российский университет дружбы народов, Москва

Коновалов Андрей Сергеевич – заместитель генерального директора по науке ООО «НекстБио», Москва