

На правах рукописи

Махлай Наталья Сергеевна

Разработка препаратов для выявления и идентификации

Trichomonas vaginalis

03.02.03 – микробиология

03.01.06 – биотехнология

(в том числе бионанотехнологии)

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Москва - 2012

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, член-корр.

Жебрун Анатолий Борисович

РАМН, профессор

Кандидат химических наук

Вербов Вячеслав Николаевич

Официальные оппоненты:

Иванов Андрей Михайлович - доктор медицинских наук, профессор, начальник кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики Федерального государственного военного образовательного учреждения высшего профессионального образования Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации;

Алиева Елена Васильевна - доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической фармакологии, бактериологии, аллергологии и иммунологии факультета последипломного и дополнительного образования Ставропольской государственной медицинской академии.

Ведущая организация Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского (ННГУ), г. Н. Новгород.

Защита состоится «__» _____ 2012 г. в ___ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора) по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Автореферат разослан «__» _____ 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Урогенитальный трихомониаз - паразитарное заболевание мочеполовой системы мужчин и женщин, вызываемое простейшим одноклеточным паразитом *Trichomonas vaginalis*. За последние 5 лет заболеваемость трихомониазом в РФ составила около 200 случаев на 100 тыс. населения (Кубанова А.А. с соавт., 2010). Это самый высокий показатель в структуре инфекций, передающихся половым путем (ИППП). При этом прослеживается положительная тенденция к снижению уровня заболеваемости трихомониазом, но отмечается рост скрытых и малосимптомных форм со стертой клинической картиной заболевания, затрудняющей своевременную диагностику и лечение (Иванова М.А. с соавт., 2009).

В связи с тем, что клинические симптомы довольно часто не отражают реальной картины заболевания и в соответствии с протоколом ведения больных урогенитальным трихомониазом (утв. МИНЗДРАВСОЦРАЗВИТИЯ РФ 14.01.2005) основными методами обнаружения трихомонад являются микроскопический и культуральный. При этом сложилась парадоксальная ситуация: при высоком уровне заболеваемости трихомониазом в России отсутствует производственный выпуск стандартных, разрешенных к применению отечественных питательных сред для культуральной диагностики данного заболевания. В клинко-диагностических исследованиях используют не зарегистрированные или зарубежные среды, что в первом случае влияет на достоверность и воспроизводимость результатов, а во втором случае - на стоимость исследований.

Использование методов амплификации нуклеиновых кислот, в частности ПЦР, может иметь большое практическое значение (Мустафина Г.Р., 2010), но поскольку регламентированными являются микробиологические методы диагностики, их совершенствование по-прежнему актуально.

В сложившихся условиях микроскопия нативного и окрашенного препаратов, несмотря на низкую чувствительность метода (38% - 82%), широко используется в лабораторной диагностике трихомониаза (Адаскевич В.П., 1999; Копылов В.М. с соавт., 2001; Юнусова Е.И., 2009; Wiese W. et al., 2000). Повышение чувствительности и объективности данного метода может быть достигнуто за счет специфического окрашивания клеток, в частности с использованием флуоресцеинмеченных антител. Показано, что метод ПИФ менее чувствителен, чем культуральное исследование, но более - чем микроскопия нативного препарата (Smith R. F., 1986; Krieger J.N. et al., 1988). Неоспоримыми преимуществами ПИФ являются скорость постановки реакции и отсутствие строгих температурных требований при проведении исследования. В связи с этим разработка метода ПИФ для выявления *T. vaginalis* может иметь

практическое значение. Необходимо отметить, что в настоящее время отечественных, зарегистрированных коммерческих тест-систем для выявления *T. vaginalis* методом ПИФ не существует. Вероятно, это обусловлено тем, что трихомонады являются труднокультивируемыми простейшими, и это существенно осложняет стадию получения материала для иммунизации.

Традиционная специфическая терапия трихомониаза заключается в применении препаратов группы 5-нитроимидазола (5-НИМЗ), обладающих высокой активностью в отношении *Protozoa* (Падейская Е.Н., 2000). В последние годы актуальна также другая группа этиотропных средств – препараты 5-нитрофурана (5-НИТФ), в частности нифуратель. Нитрофураны в качестве монотерапии обычно используют в тех случаях, когда лечение 5-нитроимидазолами невозможно, например, в случаях имеющейся гиперчувствительности.

Первые случаи резистентности *T. vaginalis* к метронидазолу были зарегистрированы в 1962 г (Urcroft P. et al., 2001). По оценке CDC, 5% клинических изолятов *T. vaginalis* устойчивы к метронидазолу (Рахматулина М.Р., 2009). В настоящее время в мире не существует стандартных методик лечения трихомониаза, обусловленного метронидазолрезистентными штаммами *T. vaginalis*, хотя сообщения о выделении таких штаммов продолжают появляться (Lewis D.A. et al., 1997; Schwebke J.R. et al., 2006). Неэффективность терапии урогенитального трихомониаза может быть обусловлена целым рядом факторов, связанных с особенностями как макро-, так и микроорганизмов. К числу наиболее частых причин неэффективности лечения большинство авторов относят недостаточно высокую комплаентность пациентов и реинфекцию, хотя в отдельных статьях ведущее место отводится резистентности *T. vaginalis* к метронидазолу (Белькова Ю.А. и соавт., 2007). Для определения чувствительности *T. vaginalis in vitro* к различным лекарственным средствам используют метод серийных разведений, разработанный в 1978 году (Meingassner J. G. et al., 1978). Однако его использование для рутинной диагностики является трудоемкой процедурой, поэтому применяется лишь в исследовательских целях.

Таким образом, в связи с отмеченной медицинской и социальной значимостью заболевания, обусловленного *T. vaginalis*, разработка новых диагностических препаратов представляет важную задачу.

Цель исследования - разработать тест-системы для выявления и идентификации *T. vaginalis* и для определения чувствительности трихомонад к противопротозойным препаратам.

Задачи исследования

1. Разработать бессывороточную селективную накопительную питательную среду для выявления возбудителя трихомониаза.

2. Разработать препарат для идентификации *T. vaginalis* методом прямой иммунофлуоресценции.

3. Провести сравнительное изучение методов лабораторной диагностики трихомониаза в модельном эксперименте.

4. Разработать набор для определения чувствительности *T. vaginalis* к противопротозойным препаратам.

Научная новизна работы

Разработана рецептура и методика приготовления бессывороточной селективной накопительной питательной среды, обладающей высокими ростовыми свойствами для простейшего вида *T. vaginalis* и не уступающей коммерческой среде Vagicult (Orion Diagnostica, Финляндия), что способствует повышению качества лабораторной диагностики трихомониаза. Увеличение ростовых свойств достигнуто за счёт введения в плацентарный бульон лизата клеток L-41, как наиболее эффективного стимулятора роста. Разработаны и экспериментально обоснованы требования к основным показателям качества питательной среды при её серийном выпуске.

Показана возможность конструирования ФИТЦ-конъюгата на основе смеси IgG к комплексу антигенов лизированных клеток *T. vaginalis* и рекомбинантному белку AP65 для выявления *T. vaginalis* методом ПИФ. Предложено применять ФИТЦ-конъюгат после культивирования с целью увеличения специфичности исследования за счёт иммунохимического связывания конъюгата с антигенами возбудителя.

В результате проведенного модельного эксперимента с использованием клинического образца дана сравнительная оценка существующих методов лабораторной диагностики трихомониаза и установлено, что культуральный метод позволяет выявлять возбудителя при наличии в исследуемом материале не менее чем 10^3 кл/мл, что в 100 раз превышает чувствительность метода световой микроскопии.

Впервые разработана тест-система для определения чувствительности *T. vaginalis* к производным 5-нитроимидазола, 5-нитрофурана и предложен критерий определения жизнеспособности клетки *T. vaginalis* на основе использования витальной окраски нативных препаратов, который позволяет сократить время при учете результатов исследования.

Практическая значимость

Применение разработанной и усовершенствованной стандартной сухой питательной среды (СВТ), обеспечивающей регистрируемый рост возбудителя при посевной дозе 10^3 клеток *T. vaginalis* и отсутствие роста грамположительной и грамотрицательной микрофлоры, а также грибов рода *Candida*, повысило стабильность микробиологических исследований. Сконструированная питательная среда, выпускаемая в обезвоженном виде с длительным сроком

годности (срок наблюдения более 2 лет), для практического применения готовится путем растворения сухой среды в дистиллированной воде при температуре 25 °С (время приготовления - 1-2 мин). Среда стандартна, не требует фильтрации, корректировки рН, стерилизации, добавления *ex tempore* ингредиентов, чувствительна, обеспечивает обильный рост с характерной морфологией при оптимальном физиологическом состоянии простейшего.

Отработана методика приготовления и использования смеси ФИТЦ-антител к комплексу антигенов *T. vaginalis* для идентификации трихомонад методом ПИФ и определено место данного метода в структуре других лабораторных методов идентификации *T. vaginalis*.

Предполагаемый серийный выпуск и внедрение в практику здравоохранения разработанной тест-системы для определения чувствительности *T. vaginalis* к противопротозойным препаратам (СВТ-АЧ) существенно сократит время и трудоемкость микробиологического исследования по сравнению с классическим методом и позволит проводить своевременную адекватную терапию.

Проведено депонирование трех штаммов *T. vaginalis* в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» с присвоением следующих коллекционных номеров: В-7140, В-7141, В-7142. Штаммы используются в контроле при производстве питательной среды СВТ.

Внедрение результатов в практику

На питательную среду для выявления *T. vaginalis* составлена нормативная документация (регламент производства, технические условия, инструкция по применению), прошедшая экспертизу в Лабораторном Центре ФГУ «НЦ ЭСПМ» Росздравнадзора (акт приемочных технических испытаний от 12.03.2009 г) и получено регистрационное удостоверение в едином реестре изделий медицинского назначения РФ (ФСР № 2009/05982 от 3 ноября 2009 г). Разработанная питательная среда используется в практическом здравоохранении: в 2009-2011 гг. выпущено 22 производственные серии.

На тест-систему для определения чувствительности *T. vaginalis* к противопротозойным препаратам составлена нормативная документация (регламент производства, технические условия, инструкция по применению), прошедшая экспертизу в ФГУ «НИИ физико-химической медицины» ФМБА России (протокол технических испытаний от 18.06.2011 г).

На разработанное устройство для одновременного учета результатов определения чувствительности *T. vaginalis* к семи противопротозойным препаратам оформлен патент на изобретение: Пат. 105744 RU U1 МПК G01N 33/48 Устройство для микробиологических исследований / Вербов В. Н., Махлай Н. С. (RU). Заявка № 2010124024/15. Приоритет изобретения 11.06.2010. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской

Федерации 20.06.2011. Патентообладатель ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (RU).

На штаммы *T. vaginalis* получены свидетельства о депонировании под номерами В-7140, В-7141, В-7142 в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» в качестве тест-штаммов для идентификации *T. vaginalis* при культуральном исследовании на питательных средах.

Результаты исследования внедрены в учебную работу кафедры технологии микробиологического синтеза Санкт-Петербургского государственного технологического института (Технический университет).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанная питательная среда позволяет проводить лабораторную диагностику трихомониаза культуральным методом, не уступая по ростовым и селективным свойствам среде Vagicult (Финляндия), зарегистрированной в РФ.

2. ФИТЦ-конъюгат, представляющий собой смесь антител к комплексу антигенов лизированных клеток *T. vaginalis* и рекомбинантному мембранному белку AP65 в соотношении 1:1.5, соответственно, позволяет идентифицировать *T. vaginalis* по специфическому свечению поверхностных и внутриклеточных антигенов.

3. В модельном эксперименте чувствительность методов микроскопии для выявления *T. vaginalis* составляет 10^5 кл/мл, культурального метода – 10^3 кл/мл, ПЦР – менее 10 кл/мл.

4. Разработанный набор для определения чувствительности *T. vaginalis* к противопротозойным препаратам позволяет идентифицировать штаммы *T. vaginalis* с трихомоноцидными концентрациями метронидазола более или равными 5 мкг/мл, тинидазола - 1,25 мкг/мл, секнидазола - 2,5 мкг/мл, ниморазола - 1,25 мкг/мл, орнидазол - 2,5 мкг/мл, клотримазола - 15 мкг/мл, нифурателя - 1,25 мкг/мл.

Апробация работы

Диссертация апробирована на заседании Ученого Совета ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, протокол № 10 от 26 октября 2011 г.

Результаты диссертационной работы были представлены на Международной научно-практической конференции «Современные проблемы инфекционной патологии человека» (Минск, 2009); IX Всероссийском съезде дерматовенерологов и косметологов (Екатеринбург, 2010), заседании Ученого Совета ФБУН НИИЭМ имени Пастера (протокол № 12 от 22 декабря 2010); ежегодной научной встрече сети институтов Пастера (Гонконг, 2010); III научно-практической школе-конференции «Современные технологии обеспечения биологической безопасности» (Оболенск, 2011).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ, в том числе 3 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 2 - в периодических изданиях, 9 - в материалах конференций, 2 – в сборниках научных трудов, 1 - патент на изобретение РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 127 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения и выводов. Список литературы включает 106 источников, в том числе, 43 отечественных и 63 иностранных авторов. Диссертация содержит 10 таблиц и 33 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Материалы

В исследовании использовали эталонные штаммы *T. vaginalis* В-7140, В-7141, В-7142 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» и штаммы из американской типовой коллекции культур: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 24433. Экспериментальные животные: самки кроликов породы шиншилла весом 3.0 - 3.5 кг в возрасте 1-2 года. Содержание и кормление животных проводили согласно приказу министерства здравоохранения СССР № 755 от 12 августа 1977 и № 1179 от 10 октября 1983 г.

Рекомбинантный белок (АР65) *T. vaginalis* с молекулярной массой 65 кДа (Hytest, Финляндия).

Микробиологические методы исследования

Для подсчета клеток *T. vaginalis* использовали камеру Горяева (Слюсаренко Т. П., 1984). Для определения минимальных трихомоноцидных концентраций (МТЦК) штаммы *T. vaginalis* (В-7140, В-7141, В-7142) выращивали в присутствии различных концентраций противопротозойных препаратов, полученных методом последовательного разведения препаратов в жидкой питательной среде СВТ (№ ФСР 2009/05982).

При определении МТЦК, под которой понимали наименьшую концентрацию препарата, вызывающую гибель 100% клеток трихомонад, использовали два критерия: оценку жизнеспособности возбудителя по методу витальной окраски трипановым синим и способность штаммов к последующему росту в питательной среде без добавления противопротозойных препаратов.

Физико-химические методы исследования осуществляли согласно (Сборник инструкций по общим методам контроля стерильности, физико-

химических свойств, пирогенности, на отсутствие контаминирующих агентов и токсичности медицинских биологических препаратов, 1983).

Определение рН проводили на иономере универсальном HI 8314 (HANNA Instruments, Германия). Содержание хлорид-ионов в пересчете на натрий хлористый определяли при аргенометрическом титровании. Белок, содержащийся в растворе, предварительно окисляли перманганатом калия в кислой среде.

Для определения концентрации белка в образцах плацентарного бульона, сыворотках, общеглобулиновых фракциях, фракциях после ионообменной хроматографии, растворов антител и конъюгатов использовали: биуретовый метод; спектрофотометрический метод; метод Лоури.

Содержание аминного азота определяли методом формольного титрования при блокировании формальдегидом при рН=7,0 свободных аминогрупп и титровании щелочью эквивалентного количества карбоксильных групп.

Содержание общего азота проводили по методу Кьельдаля при минерализации органических веществ серной кислотой с последующей отгонкой и количественным учетом минерализованного азота в форме NH_4^+ .

Для получения суммарного трихомонадного антигена штаммы *T. vaginalis* (В-7140, В-7141, В-7142) культивировали на питательной среде до концентрации 10^7 кл/мл. Клетки 3хкратно отмывали в 0,9% растворе NaCl, ресуспензировали в объеме 10 мл и проводили дезинтеграцию клеточной массы на ультразвуковом дезинтеграторе УЗД-2 при 22 кГц в течение 10 мин. Полученную таким образом суспензию хранили при температуре минус 20 °С и в дальнейшем использовали в качестве материала для иммунизации.

Идентичность субстанций противопротозойных препаратов групп 5-нитроимидазола и 5-нитрофурана: метронидазол, тинидазол, ниморазол, секнидазола, орнидазол, клотримазол и нифуратель, любезно представленных фирмой ZCHEM (Китай), устанавливалась методом ядерного магнитного резонанса на протонах H^1 и C^{13} (растворы в DMSO-d_6). Спектры ЯМР снимались на спектрометре «Brucker-AM-300» в импульсном режиме накопления с последующим Фурье-преобразованием сигнала спада свободной индукции. Рабочая частота для протонов H^1 – 300 МГц; рабочая частота для углерода C^{13} – 75 МГц в условия полного подавления спин-спинового взаимодействия $\{\text{C}^{13} - \text{H}^1\}$.

Иммунохимические методы исследования

Гипериммунные сыворотки получали при иммунизации 6 самок кроликов породы шиншилла весом 3.0-3.5 кг в возрасте 1-2 лет. Трех кроликов иммунизировали антигеном в виде суспензии клеточного лизата, трех других - белком AP65 в виде раствора с концентрацией 1 мг/мл (по 100 мкг белка на

одного кролика при каждой иммунизации), для разведения использовали стерильный ФСР, рН=7,2. Введение антигена осуществляли внутривенно и внутримышечно, для усиления иммунного ответа при первой иммунизации использовали полный адъювант Фрейнда, который в дальнейшем заменили на неполный. Бустерные иммунизации проводили 3хкратно с интервалом в 21 день. Нарастание титра антител определяли на 8, 28, 49, 78, 97 днях иммунизации. Специфическую активность полученных сывороток проверяли в твердофазном иммуноферментном анализе с использованием белка А, ковалентно связанного с пероксидазой хрена, в качестве конъюгата.

Выделение общеглобулиновой фракции проводили методом высаливания из цельной сыворотки сернокислым аммонием $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Anaoкар S. et. al., 1979). Осаждение проводили трехкратно при 50 % насыщении при рН=7,2 и температуре 4 °С. Освобождения от сульфата аммония осуществляли путем диализа против 0,01 М ФБР. Удельный титр рассчитывали по формуле: $T_{уд.} = T/C$, где T – титр антител, C – концентрация белка в мг/мл.

Фракционирование проводили на ионообменнике с ДЭАЭ-целлюлозой (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Германия) в градиенте концентраций хлористого натрия при рН=6,3. На колонку с сорбентом (60x4 см), уравновешенную 0,0175М фосфатно-буферным раствором при рН=6,3, наносили белок в том же буфере. Скорость протекания жидкости через колонку составляла 80 мл/ч. Элюирование белков с колонки проводили буферными растворами с линейным градиентом концентраций NaCl, получив, таким образом, четыре пика: бессолевой, 0,07М NaCl, 0,17М NaCl, 0,38М NaCl. В полученных пиках определяли специфическую активность и белок, после этого наиболее активные фракции объединяли и при необходимости концентрировали.

Конъюгацию иммуноглобулинов с ФИТЦ фирмы «Sigma» проводили по стандартному протоколу конъюгирования антител. Перед маркировкой раствор иммуноглобулинов в течение ночи диализовали при температуре 4 °С против 0,01 М КБК, рН=9,5. Для оптимального соотношения краситель/белок вносили 12,5 мг красителя на грамм белка. Для этого 1 мг красителя растворяли в 2 мл 0,1 М Na_2HPO_4 и медленно по каплям добавляли к раствору иммуноглобулинов при постоянном перемешивании. Избыток красителя удаляли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25. Раствор с белком и свободным красителем наносили на колонку и промывали 0,01 М ФСБ рН=7,2 со скоростью 40-50 мл/ч. После выхода свободного объема колонки собирали белковые фракции. Качество приготовленных конъюгатов оценивали по показателю концентрации белка и молярного соотношения ФИТЦ/белок. Спектрофотометрически определяли показатели оптической плотности цельного конъюгата и его разведений при длине волны 280 и 495 нм.

Планирование эксперимента и статистическая обработка результатов

Планирование эксперимента осуществляли согласно методу ортогональных латинских прямоугольников (матрица 3x3). При определении оптимума выхода по трем факторам использовали экспрессный метод. Вначале, зафиксировав значение двух факторов на любом уровне, изучали зависимость выхода от третьего и устанавливали частный оптимум по данному фактору. Также находили частные оптимумы для двух других факторов.

Достоверность полученных результатов определяли с помощью компьютерной программы «Statistica 7.0» и «Excel 5.0», все данные представлены в виде $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Разработка бессывороточной селективной питательной среды для культивирования *T. vaginalis*

На основе плацентарного бульона была сконструирована бессывороточная селективная накопительная питательная среда, в которой учтены биологические особенности трихомонад. Среда представляет собой лиофильно высушенный концентрат, содержащий на 1 л готовой среды: NaCl – 5,0 г; K_2HPO_4 – 2,0 г; KH_2PO_4 – 1,0 г; мальтоза – 6,0 г; солянокислый цистеин – 1,2 г, аскорбиновая кислота – 0,24 г, плацентарный бульон 100 мл, дрожжевой экстракт – 11 г, аминокептид – 25 мл, лизат клеточной линии L-41 – 24 мл. При выборе оптимальных концентраций компонентов (дрожжевого экстракта, аминокептида, лизата клеток L-41) рН среды задавали как константную величину на уровне $6,8 \pm 0,2$. Из полученных данных следует (Рис. 1), что концентрации дрожжевого экстракта в диапазоне 1 – 8 г/л можно оценить как лимитирующие, а в диапазоне 14-20 г/л – как ингибирующие. Концентрации аминокептида, обеспечивающие стационарную область роста возбудителя, находились в диапазоне 4,0-6,5%. Концентрации аминокептида ниже 4,0% не обеспечивали интенсивного роста *T. vaginalis* (Рис. 2). Оптимальная концентрация лизата клеток L-41 находилась в диапазоне 2,0-2,8% (Рис. 3). Аминокептид и лизат клеток L-41 оказывают существенное влияние на рост возбудителя по сравнению с другими добавками уже через 48 ч.

При оптимизации состава питательной среды мы учитывали эффект совместного влияния последних трех компонентов на величину урожая культуры. Совместное влияние дрожжевого экстракта, аминокептида и лизата клеток L-41 исследовали с использованием метода математического планирования трехфакторного эксперимента. При этом каждый уровень любого фактора сочетался одинаковое количество раз со всеми уровнями остальных факторов. Эффект определенного уровня фактора рассчитывали как разницу

среднего значения выхода во всех вариантах, где данный фактор находился на этом уровне, и среднего значения выхода для всей серии опытов. Результаты проведенных опытов показали, что в жидкой питательной среде оптимальное соотношение дрожжевого экстракта, аминокептида и лизата клеток L-41 было 12 г; 2,5% и 2,4 %, соответственно.

При изучении влияния рН на ростовые качества среды было показано (Рис. 4), что оптимальное значение рН находится в диапазоне 6,0-7,0.

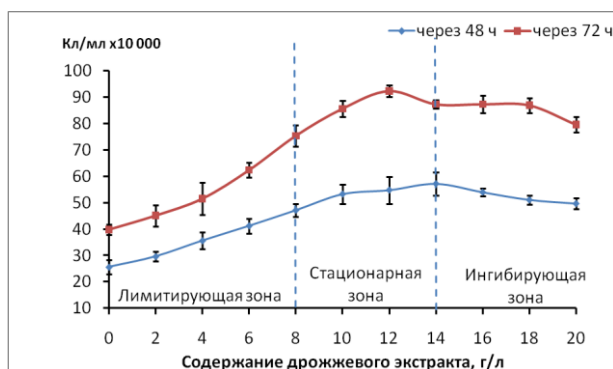


Рисунок 1. Влияние дрожжевого экстракта на рост *T. vaginalis*.

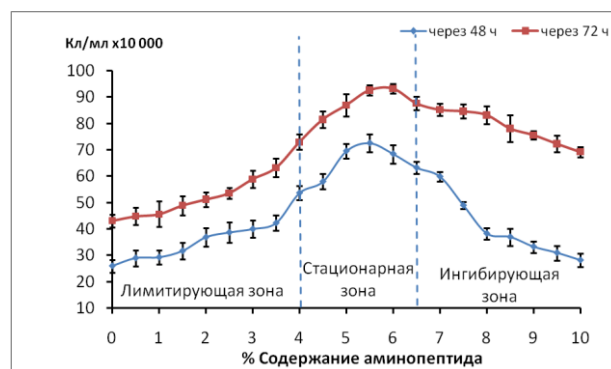


Рисунок 2. Влияние аминокептида на рост *T. vaginalis*.

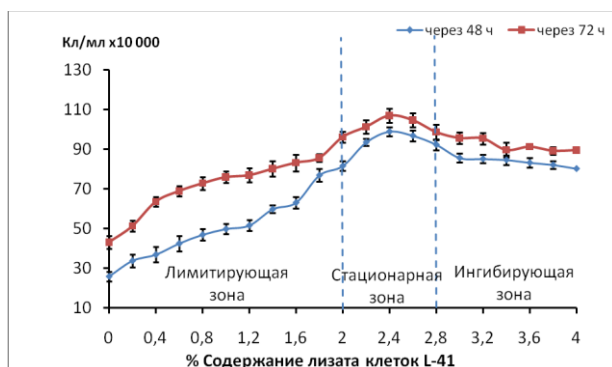


Рисунок 3. Влияние лизата клеток L-41 на рост *T. vaginalis*.

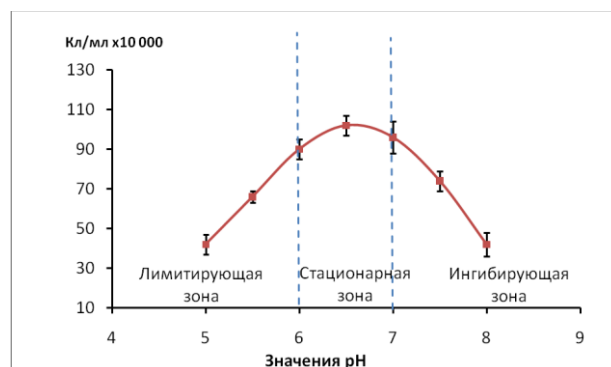


Рисунок 4. Влияние pH на рост *T. vaginalis*.

После оптимизации ростового состава питательной среды была проведена серия опытов по выбору состава селективного компонента. Анализ экспериментальных данных показал, что накопительная селективная питательная среда полностью ингибирует рост грамположительных и грамотрицательных бактерий в концентрации 10^4 КОЕ/мл, оказывает микостатический эффект на дрожжеподобные грибы рода *Candida* в концентрации 10^3 КОЕ/мл при следующих концентрациях препаратов: бензилпенициллин – 1 млн.ед/л, стрептомицин сульфат – 2 г/л, линкомицин гидрохлорид – 0,57 г/л, флуконазол – 0,066 г/л. Для оценки ростовых свойств разработанной питательной среды СВТ проводили ее засев инокулятом,

содержащим различное количество клеток простейшего. Для этого готовили серийные десятикратные разведения суспензии с концентрацией *T. vaginalis* 10^6 кл/мл. Посевы инкубировали в течение 5 суток при температуре 37 ± 1 °С. Число подвижных клеток определяли с использованием камеры Горяева. Динамика накопления *T. vaginalis* представлена в табл. 1. Питательная среда СВТ обеспечивает накопление культуры при разной посевной дозе, однако для диагностики заболевания одним из важнейших параметров питательной среды является возможность вести культивирование из образца, содержащего малое количество клеток. Мы определили, что количество вносимых клеток трихомонад, необходимое для их регистрируемого роста на разработанной питательной среде, составляет $10^3 - 10^2$ клеток. Вне зависимости от посевной дозы ($10^3 - 10^4$ клеток) уже через 72 ч число выросших, подвижных клеток *T. vaginalis* сравнивалось.

Таблица 1

Динамика накопления тест-культуры *T. vaginalis* при различной посевной дозе

Сутки	Число вносимых клеток <i>T. vaginalis</i> , кл/мл			
	10^5	10^4	10^3	10^2
2	$(13,5 \pm 2,4) \times 10^5$	$(3,8 \pm 0,1) \times 10^5$	$(1,8 \pm 0,9) \times 10^3$	-
3	$(4,0 \pm 40,4) \times 10^6$	$(7,3 \pm 1,7) \times 10^5$	$(12,5 \pm 2,2) \times 10^5$	$(4,7 \pm 0,4) \times 10^4$
4	$(2,5 \pm 0,1) \times 10^6$	$(20 \pm 2,8) \times 10^5$	$(30,0 \pm 4,0) \times 10^5$	$(2,7 \pm 0,1) \times 10^5$
5	-	$(16 \pm 2,5) \times 10^5$	$(22,0 \pm 2,9) \times 10^5$	$(2,1 \pm 0,3) \times 10^5$

Для сравнительной оценки питательной среды СВТ использовали среду Vagicult (Orion Diagnostica, Финляндия). Данная среда является единственной питательной средой зарубежного производства, зарегистрированной в РФ (№ ФС 2004/12084.08.2004). Использовали клинический материал, полученный от пациентов, обратившихся в НИИЭМ Пастера в 2008 году, с хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза и с проблемой бесплодия. Всего было обследовано 170 человек, из них 93 мужчины и 77 женщин в возрасте от 18 до 56 лет. Клиническим материалом от мужчин служили: отделяемое уретры, секрет предстательной железы и эякулят. У женщин исследовали вагинальное отделяемое и материал из уретры. Исследование проводили культуральным методом и при микроскопии мазков, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Питательную среду Vagicult использовали в соответствии с инструкцией производителя. Материал от пациентов помещали в пробирки с прогретой до 37°C питательной средой и сразу помещали в термостат. Учет

результатов проводили на 4 сутки для среды СВТ и на 3 сутки для среды Vagicult (согласно инструкции по применению). Результаты представлены в обобщенной табл. 2.

В результате культурального исследования *T. vaginalis* была выявлена в 13 (7,6 %) и 17 (10,0 %) случаях при использовании среды Vagicult и СВТ соответственно. При исследовании материала от женщин микроскопическим методом *T. vaginalis* была идентифицирована в 4 (5,2 %) случаях, тогда как по результатам только культурального исследования на среде СВТ было получено 5 (6,5 %) положительных результатов, а на среде Vagicult – 3 (3,9 %). Это связано, прежде всего с тем, что во многих образцах присутствовали дрожжеподобные грибы преимущественно рода *Candida*, которые ингибировали рост *T. vaginalis* на питательной среде Vagicult поскольку в состав данной среды не включены антимикотики и противогрибковые препараты. При анализе результатов, полученных при исследовании образцов от мужчин, чувствительность культурального исследования оказалась в несколько раз выше по сравнению с микроскопическим исследованием. При этом стоит отметить, что дрожжеподобные грибы в этом случае выявлялись гораздо реже.

Таблица 2

Результаты испытания питательных сред для выявления *T. vaginalis*

Количество обследованных	Микроскопия	Культуральное исследование на среде	
		Vagicult	СВТ
Муж (93)	1 (1,0 %)	10 (10,8 %)	12 (12,9 %)
Жен (77)	4 (5,2 %)	3 (3,9 %)	5 (6,5%)
Всего:	5 (2,9 %)	13 (7,6 %)	17 (10,0 %)

Таким образом, на основании полученных результатов по оптимизации ростовых и селективных компонентов среды был сформулирован состав селективной, накопительной среды для культивирования *T. vaginalis*, обеспечивающий регистрируемый рост возбудителя при посевной дозе 10^2 - 10^3 клеток и отсутствие роста грамположительной и грамотрицательной микрофлоры, а также грибов рода *Candida*. На разработанную среду СВТ получено регистрационное удостоверение № ФСР №2009/05982 от 3 ноября 2009 г. Налажен серийный выпуск среды СВТ на базе отдела новых технологий НИИЭМ имени Пастера.

2. Разработка набора для идентификации *T. vaginalis* методом прямой иммунофлуоресценции

При разработке различных вариантов иммунохимической диагностики трихомониаза прежде всего встает вопрос о получении гипериммунных сывороток, выделении из них специфических антител и приготовлении на их основе конъюгатов. Большое значение при этом имеет природа антигена и выбор схемы иммунизации. В нашем случае при использовании двух антигенов (комплексный антиген лизированных клеток *T. vaginalis* и рекомбинантный белок AP65) было показано нарастание титра сывороток в течение 70 дней, после чего были получены антисыворотки, титры которых не увеличивались после реиммунизации (Рис. 5). При иммунизации комплексным антигеном лизированных клеток *T. vaginalis* максимальные титры сывороток в непрямом варианте ИФА составили 1:10240, а при иммунизации рекомбинантным белком AP65 титры сывороток были в 2 раза выше. По отработанной схеме иммунизации были получены высокотитражные антитрихомонадные сыворотки, которые в дальнейшем послужили основой для выделения специфических компонентов тест-системы.

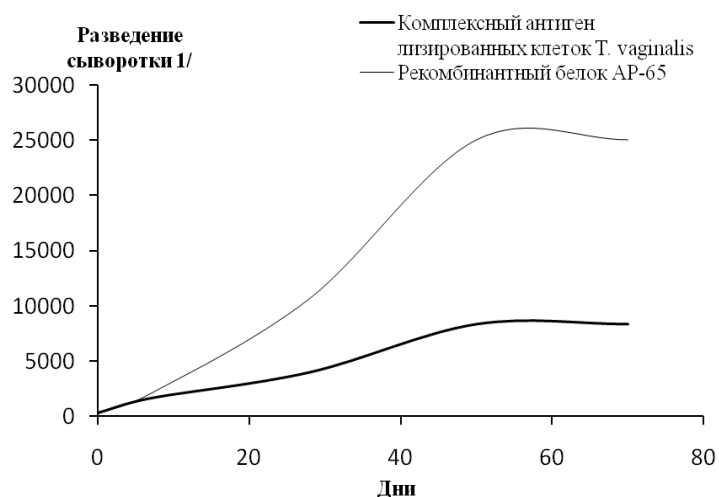


Рисунок 5. Титры сывороток, полученных при иммунизации трихомонадными белками (n=3).

При выделении иммуноглобулинов на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой получили 4 хроматографические фракции. Анализ содержания белка и титров антител на этапе фракционирования показал, что специфические антитела содержались в основном в первой (бессолевой) и второй (0,07 М NaCl) фракциях (Рис. 6). Эти фракции после объединения и концентрирования использовали для получения ФИТЦ-конъюгатов. Выход очищенного иммуноглобулина составил 260 мг/мл.

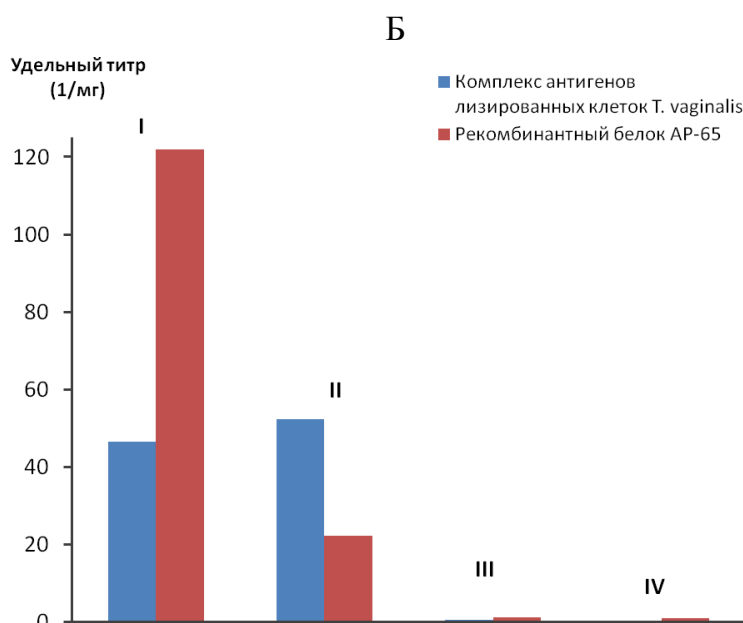
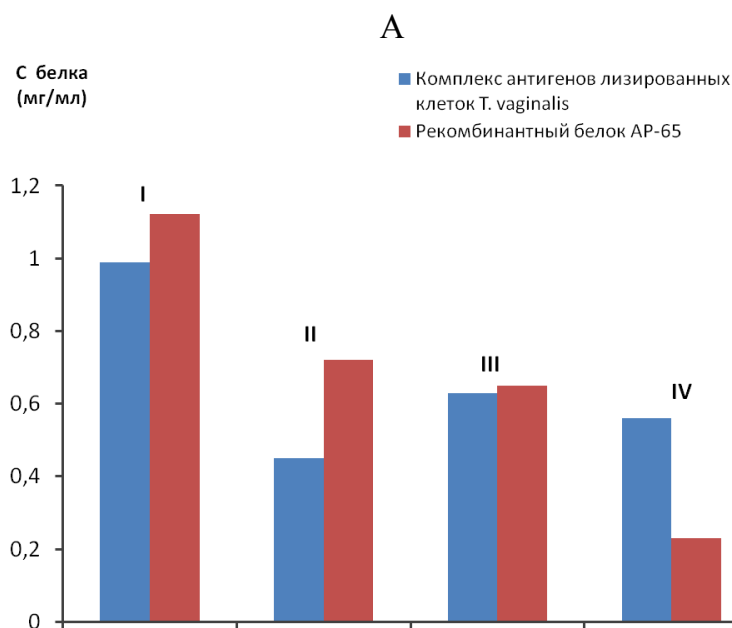


Рисунок 6. Характеристика фракций, полученных в ходе ионнообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой, где 1 – фракция I, 2 – фракция II, 3 – фракция III, 4 – фракция IV. (А – средние величины концентрации белка (мг/мл), Б – Распределение удельной специфической активности по фракциям).

Для определения чувствительности полученных конъюгатов готовили фиксированные спиртом препараты, на которые наносили по 20 мкл раствора флуоресцирующих иммуноглобулинов в смеси с контрастирующим веществом. Для контрастирования использовали синьку Эванса и родамин. Окрашивание вели в течение 30 мин во влажной камере при температуре 37°C. Оценку свечения проводили по четырехбальной шкале в зависимости от степени свечения: 0 - отрицательная реакция, 1б - беловатое свечение; 2б - умеренное

зеленовато-желтое свечение; 3б - яркое зеленовато-желтое свечение; 4б - сияющее зеленовато-желтое свечение. Рабочим разведением конъюгатов считали результат микроскопии при обнаружении свечения, оцениваемого не ниже чем на три балла для всех тестируемых штаммов.

При микроскопии препаратов, окрашенных полученными ФИТЦ антителами к комплексному антигену лизированных клеток *T. vaginalis* и к белку AP65, было выявлено специфическое зеленое свечение на четыре балла клеток трихомонад при концентрации конъюгатов 1000 мкг/мл и 580 мкг/мл, соответственно. Использование 0,01% раствора голубого Эванса в отличие от родамин увеличивает контрастность получаемого изображения и делает результаты микроскопии более однозначными (Рис. 9). Удобнее работать с конъюгатом, который был получен на основе комплексного антигена лизированных клеток *T. vaginalis*, поскольку он дает свечение всей клетки (Рис. 7), тогда как при окрашивании конъюгатом к белку AP65 свечение наблюдается на поверхности всей или части клетки в виде гранул (Рис. 8,9).

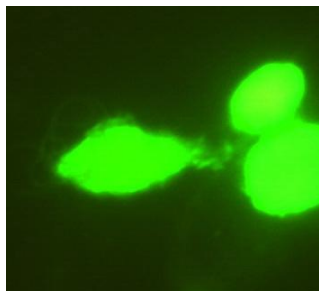


Рисунок 7. Клетки *T. vaginalis* (шт. В-7140), конъюгат к комплексному антигену. Ув.× 1000.

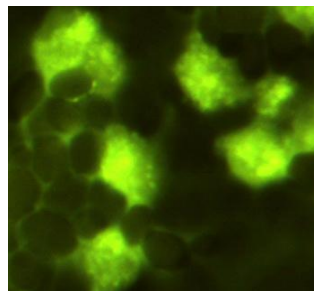


Рисунок 8. Клетки *T. vaginalis* (шт. В-7141) на фоне *C. albicans*, конъюгат к белку AP65, родамин. Ув.× 1000.

Использование смеси полученных конъюгатов в разных соотношениях для окрашивания тех же штаммов позволило получить следующую картину: часть клеток окрашивалась полностью, у остальных свечение наблюдалось только в виде гранул. Поэтому для дальнейшей работы мы использовали смесь конъюгатов в соотношении по белку 1:1,5 (Рис. 10).

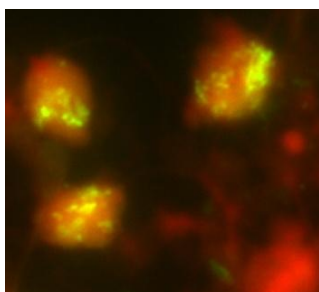


Рисунок 9. Клетки *T. vaginalis* (шт. В-7140) на фоне сперматозоидов, конъюгат к белку AP65, голубой Эванса. Ув.× 1000.

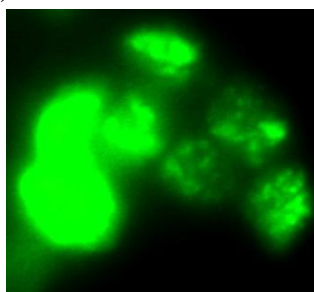


Рисунок 10. Клетки *T. vaginalis* (шт. В-7142) при окраске смесью из двух конъюгатов. Ув.× 1000.

Таким образом, разработана тест-система для идентификации *T. vaginalis* методом ПИФ на основе ФИТЦ меченного конъюгата из смеси антител к комплексному антигену лизированных клеток *T. vaginalis* и белка AP65 в соотношении по белку 1:1,5 соответственно. В предварительных модельных испытаниях показана возможность его использования для выявления *T. vaginalis* при наличии в исходном материале минимум 10^5 кл/мл простейших.

3. Сравнение методов лабораторной идентификации *T. vaginalis* в модельном эксперименте

Основным критерием оценки различных способов выявления того или иного возбудителя кроме специфичности является диагностическая чувствительность, которая напрямую зависит от его выявляющей способности - аналитической чувствительности. Чувствительность методов идентификации *T. vaginalis* определяли при использовании суспензии клеток трихомонад с известной исходной концентрацией 10^6 кл/мл в качестве модели клинического образца. Далее готовили последовательные десятикратные разведения исходной суспензии клеток таким образом, чтобы в последнем разведении было менее 10 клеток простейшего на 1 мл физиологического раствора. Аликвоты из каждого полученного разведения использовали для исследования тремя существующими методиками идентификации *T. vaginalis*: 1) метод ПЦР; 2) методы микроскопии в следующих вариантах: нативная микроскопия; микроскопия препаратов, окрашенных по Романовскому-Гимзе; микроскопия препаратов, окрашенных ФИТЦ-антителами; 3) культуральный метод.

Оценивая результаты модельного эксперимента, следует отметить высокую чувствительность метода ПЦР: ДНК *T. vaginalis* была выявлена в образце с содержанием единичных клеток, что подтверждает данные литературы (Рыжих П.Г. и соавт, 2011).

Оценивая результаты двух методик микроскопии (табл. 3) надо отметить, что при высокой концентрации клеток *T. vaginalis* всеми методиками было выявлено достаточное содержание клеток в каждом поле зрения микроскопа. Однако при проведении микроскопии «нативного» препарата был возможен учет характерного признака *T. vaginalis* – специфическая подвижность, которая утрачивается при фиксации клетки. При микроскопии препаратов, приготовленных из разведений с концентрации простейших менее 10^6 кл/мл, возникли трудности для учета результатов, поскольку для поиска объекта было необходимо просматривать более ста полей зрения. Тем не менее, нахождение даже одной клетки с морфологической принадлежностью и типичной подвижностью *T. vaginalis* служит признаком наличия заболевания. Но в практике при микроскопическом исследовании образцов, в которых на фоне клеточных элементов, обязательно присутствующих в клиническом материале

(эпителиальные клетки, лейкоциты, клетки сперматогенеза, дрожжеподобные грибы), возможность идентифицировать не в каждом поле зрения две-три клетки *T. vaginalis*, быстро утрачивающих подвижность, может создавать предпосылки для разночтения результатов. Специфическое окрашивание клеток трихомонад с помощью ФИТЦ конъюгированных антител к *T. vaginalis* достоверно не повышает чувствительность метода микроскопии. Поэтому использование метода микроскопии для диагностики трихомониаза оправдано при наличии в исследуемом материале более 10^5 кл/мл и метод ПИФ является эффективной альтернативой весьма субъективному микроскопическому методу.

Таблица 3

Сравнительная оценка чувствительности методов выявления при различном содержании клеток *T. vaginalis* (n=3)

Содержание кл/мл	Метод микроскопии			Культуральное исследование	ПЦР
	Нативный препарат	Окрашенный препарат	ПИФ		
4×10^6	46 ± 1 в каждом п/з	200 в каждом п/з	200 в каждом п/з	200 в каждом п/з	+
4×10^5	4 ± 1 в каждом п/з	12 ± 1 в каждом п/з	17 ± 1 в каждом п/з	200 в каждом п/з	+
4×10^4	$2,0 \pm 0,1$ в каждом п/з	$1,0 \pm 0,4$ в каждом п/з	$2,0 \pm 1,1$ в каждом п/з	$6,0 \pm 0,4$ в каждом п/з	+
4×10^3	-	-	-	$1,0 \pm 0,1$ в каждом п/з	+
4×10^2	-	-	-	-	+
4×10^1	-	-	-	-	+

При проведении культурального исследования нами были получены следующие результаты: при высокой концентрации клеток простейших в посевной дозе после 48 ч инкубации на во всех полях зрения микроскопа было зафиксировано более 200 клеток трихомонад. Причем содержание неподвижных клеток составляло не более 3-4%, что соответствует экспоненциальной фазе роста микроорганизма. При содержании простейших в посевной дозе 10^3 кл/мл было зафиксировано не более 1 клетки не в каждом поле зрения микроскопа через 96 ч культивирования. Дальнейшая инкубация пробирок не приводила к

увеличению содержания клеток, и через 7 суток от начала культивирования в этих пробирках были выявлены только мертвые клетки трихомонад.

4. Разработка тест-системы для определения чувствительности *T. vaginalis* к противопротозойным препаратам

С целью создания тест-системы был решен ряд научно-технологических задач: определены МТЦК противопротозойных препаратов (метронидазол, тинидазол, орнидазол, клотримазол, секнидазол, ниморазол, нифуратель), определено оптимальное время культивирования в лунках планшетов, выбрана посевная доза заражающего материала и установлен критерий определения жизнеспособности клетки *T. vaginalis* после культивирования в присутствии противопротозойных препаратов.

При культивировании штаммов *T. vaginalis* в лунках плоскодонных полистироловых планшетов было установлено, что максимальный прирост биомассы происходит через 48 ч культивирования при посевной дозе заражающего материала 5×10^4 кл/мл.

При определении МТЦК₁₀₀, под которой понимали 100% гибель клеток *T. vaginalis*, использовали два критерия: оценку жизнеспособности возбудителя по методу витальной окраски трипановым синим и способность штаммов к последующему росту в питательной среде без добавления противопротозойных препаратов. На рис. 11 представлена микрофотография клеток *T. vaginalis* после культивирования в присутствии метронидазола в концентрации 1,25 мкг/мл, при этом в соответствии с методикой мертвые клетки окрашены в ярко-синий цвет, а у живых клеток цитоплазма бесцветная. Сравнение использования данного подхода одновременно с проведением повторного посева культур на свежую питательную среду показало 100% совпадение результатов исследования: МТЦК, определенные при окраске трипановым синим, совпадали с МТЦК, определенными после повторного культивирования культур на свежей питательной среде.

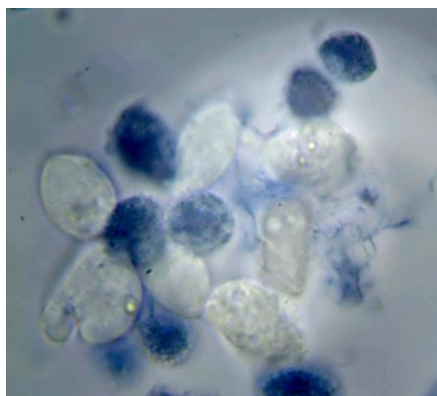


Рисунок 11. Клетки *T. vaginalis* в «нативном» препарате, содержащем трипановый синий (ув.1000).

По-нашему мнению, данная методика может быть применена при определении жизнеспособности клеток трихомонад для сокращения времени исследования и наглядности результатов. Полученные нами результаты подтверждают перспективность использования данной методики для длительного поддержания штаммов *T. vaginalis* на питательных средах (Hyun-Ouk S. Et al., 2010; Wassmann C. Et al., 1999).

Данные по определению МТЦК₁₀₀ приведены в табл.4.

Таблица 4

Минимальные трихомоноцидные концентрации противопротозойных препаратов

Концентрация препарата, мкг/мл	Название препарата						
	Клотримазол	Нифуратель	Секнидазол	Орнидазол	Ниморазол	Тинидазол	Метронидазол
20	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-	-
2,5	+	-	-	-	-	-	+
1,25	+	-	+	+	-	-	+
0,5	+	+	+	+	+	+	+
0	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: «-» - отсутствие живых клеток *T. vaginalis*, «+» - наличие живых клеток *T. vaginalis*.

Из полученных результатов следует, что клотримазол является наименее активным среди исследованных препаратов и его МТЦК составляет 20 мкг/мл, что совпадает с общепринятыми значениями. Значения МТЦК для остальных исследованных препаратов следующие: метронидазол – 5 мкг/мл, секнидазол – 2,5 мкг/мл, орнидазол – 2,5 мкг/мл, ниморазол – 1,25 мкг/мл, тинидазол – 1,25 мкг/мл, и нифуратель – 1,25 мкг/мл.

С целью фиксации препаратов в лунки 8-луночных стрипов вносили по 20 мкл растворов в рабочих концентрациях и высушивали при температуре 50 °С в вакуумном сушильном шкафу в течение 24 ч. После фиксации проводили испытание по сохранению активности препаратов, а также рассчитывали срок их годности при экспериментальном хранении в герметично упакованном виде в термостате при температуре 37°С в течение 6 месяцев. В результате был

рассчитан срок годности зафиксированных в лунках препаратов, равный 13 месяцам.

Для апробации полученных стрипов с фиксированными антипротозойными препаратами было исследовано 109 штаммов *T. vaginalis*, выделенных от больных с установленным диагнозом трихомониаз. Диагноз был установлен на основе культурального исследования на питательной среде оптимального состава СВТ, а также методом ПЦР-РТ с использованием набора фирмы ИнтерЛабСервис (№ ФС 01262006/5190-06) на приборе АНК-32 (Синтол, Россия). При этом 10 штаммов (группа А) было выделено от больных с острой формой инфекции и 99 штаммов (группа Б) – от пациентов с хронической формой урогенитального трихомониаза, большинство из которых уже проходили стандартное антипротозойное лечение метронидазолом. Полученные результаты представлены в табл. 5. Трихомоноцидные концентрации препаратов для штаммов, изолированных у пациентов с острой формой трихомонадной инфекции, были меньше или равны установленным, в то время как минимальные трихомоноцидные концентрации для штаммов, выделенных от пациентов с хроническим трихомонозом - выше установленных. Такое различие свойств совпадает с имеющимися данными литературы о неэффективности лечения заболевания, обусловленного устойчивостью трихомонад к препаратам лечения, и свидетельствует о целесообразности определения чувствительности *T. vaginalis* к противопротозойным препаратам *in vitro* до начала лечения.

Общепринятый метод определения МТЦК (Urcroft P., 2001) заключается в приготовлении серийных разведений лекарственного средства в жидкой питательной среде с последующим внесением в каждую пробирку одинаковой концентрации исследуемого штамма *T. vaginalis*. После инкубации в течение 48-72 ч в каждой пробирке проводят исследование на наличия живых форм возбудителя с помощью микроскопии (метод «раздавленная капля»). Этот метод длителен, трудоемок и имеет высокую стоимость. Для сокращения времени анализа и упрощения процедуры проведения исследований нами предложено оригинальное устройство, которое представляет собой картридж-гребенку, выполненную из двух пластин полимерного оптически прозрачного материала, которые соединены между собой в трех местах таким образом, что каждый зубец гребенки имеет внутреннюю камеру объемом 10 мкл с боковыми прорезями. Устройство используется следующим образом: в лунки стрипа помещают анализируемые жидкие пробы, а затем в них погружают зубцы картриджа-гребенки. Под действием капиллярных сил в течение 10-15 с жидкость из лунок через прорези полностью заполняет микрокамеры картриджа. Избыток жидкости удаляют прикосновением кончиков зубцов к фильтровальной бумаге. Затем картридж помещают на предметное стекло и проводят обычную световую микроскопию (патент на изобретение РФ №105744).

Таблица 5

Частота встречаемости клинических изолятов *T. vaginalis* с МТЦК больше установленных значений

Препарат	МТЦК, мкг/мл	Острый трихомониаз (n=10)	Хронический трихомониаз (n=99)
		%	%
Метронидазол	5,0	100	23,2
Тинидазол	1,25	100	58,6
Ниморазол	1,25	90	71,7
Орнидазол	2,5	100	51,5
Секнидазол	2,5	100	57,6
Клотримазол	15,0	90	60,6
Нифуратель	1,25	100	32,3

Таким образом, разработанная тест-система для определения чувствительности *T. vaginalis* к препаратам 5-нитроимидазола и 5-нитрофурана основанная на простом и доступном для рутинной лабораторной работы методе, позволяет с наибольшей эффективностью подобрать препарат для терапии.

ВЫВОДЫ

1. Определены оптимальные концентрации основных ростовых и селективных компонентов в базовом питательном бульоне для культивирования *T. vaginalis*.
2. Минимальная посевная доза *T. vaginalis* для начала культивирования на разработанной питательной среде СВТ составляет 10^3 кл/мл, при этом полностью ингибируется рост грамположительных, грамотрицательных бактерий и дрожжеподобных грибов рода *Candida*.
3. Чувствительность метода ПИФ при использовании смеси ФИТЦ-антител к комплексу антигенов лизированных клеток *T. vaginalis* и рекомбинантному белку AP65 составляет 10^5 кл/мл.
4. Метод микроскопии позволяет идентифицировать *T. vaginalis* в концентрации не менее 10^5 кл/мл, культуральный метод - не менее 10^3 кл/мл.
5. Минимальная трихомоноцидная концентрация метронидазола для штаммов *T. vaginalis*, выделенных от пациентов с хронической формой урогенитального трихомониаза, в 23,2% случаев больше 5 мкг/мл.
6. Для оценки жизнеспособности *T. vaginalis* при определении чувствительности к противопротозойным препаратам и при длительном поддержании штаммов следует использовать витальную окраску трипановым синим.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты исследования предназначены для использования специалистами в области клинической лабораторной диагностики, микробиологии и дерматовенерологии в медицинских учреждениях.

Разработанные препараты, включающие селективную накопительную питательную среду, ФИТЦ-конъюгат на основе поликлональных антител к *T. vaginalis* и тест-систему для определения чувствительности возбудителя к противопротозойным препаратам позволят проводить комплексную диагностику трихомониаза от этапа выявления заболевания до определения чувствительности *T. vaginalis* к препаратам лечения.

Штаммы *T. vaginalis* В-7140, В-7141, В-7142, депонированные в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур могут быть использованы в качестве эталонных культур в качестве тест-штаммов для идентификации *T. vaginalis* при культуральном исследовании на питательных средах.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Махлай Н. С.** Бессывороточная питательная среда для культивирования трихомонад / Н. С. Махлай, В. Н. Вербов // Материалы IX съезда всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Москва. - 2007. - С. 63.

2. **Махлай Н. С.** Культивирование трихомонад на бессывороточной питательной среде / Н. С. Махлай, Л. А. Березина, В. Н. Вербов // Мат. V съезда Общества биотехнологов России им. Ю. А. Овчинникова, Москва. - 2008. – С. 276.

3. Березина Л.А. Изменчивость трихомонад при длительном культивировании на питательных средах / Л. А. Березина, Л. Б. Куляшова, А. В. Закревская, **Н. С. Махлай** // Материалы IV международной конференции, посвященной 85-летию Санкт-Петербургского НИИЭМ имени Пастера и 120-летию Парижского института Пастера, Санкт-Петербург. - 2008. - С. 55.

4. **Махлай Н. С.** Культуральный метод в комплексной диагностике трихомониаза / Н. С. Махлай, Л. А. Березина, В. Н. Вербов, А. Б. Жебрун // Сборник научных трудов «Современные проблемы инфекционной патологии человека», Минск. - 2009. - С. 326-331.

5. **Махлай Н. С.** Разработка тест-системы для определения устойчивости *T. vaginalis* к противопротозойным препаратам / Н. С. Махлай, А. Н. Бочкарёва, В. Н. Вербов // Материалы международной конференции «Развитие научных исследований и надзор за инфекционными заболеваниями», Санкт-Петербург. - 2010. - С. 125.

6. **Махлай Н. С.** Чувствительность клинических штаммов *Trichomonas vaginalis* к противопротозойным препаратам *in vitro* / Н. С. Махлай, Л. А. Березина, В. Н. Вербов // Материалы международной конференции «Развитие научных исследований и надзор за инфекционными заболеваниями», Санкт-Петербург. - 2010. - С. 124.

7. Гушин А. Е. Молекулярно-генетическое исследование клинического материала с использованием праймеров к различным участкам генома *Trichomonas vaginalis* и различным видам царства Protozoa / А. Е. Гушин, П.Г. Рыжих, Л. А. Березина, **Н. С. Махлай** // Сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2010», Москва. - 2010. - Том III. - С. 204-207.

8. **Махлай Н. С.** Сравнительная оценка чувствительности клинических штаммов *Trichomonas vaginalis*, выделенных при острой и хронической формах инфекции / Н. С. Махлай, Л. А. Березина, В. Н. Вербов // Сборник материалов III междисциплинарной научно-практической конференции «Урогенитальные

инфекции и репродуктивное здоровье: клиничко-лабораторная диагностика и терапия», Москва. - 2010. - С. 49-50.

9. **Махлай Н. С.** Опыт длительного культивирования и хранения *Trichomonas vaginalis* in vitro / Н. С. Махлай // Тезисы научных работ XI Всероссийского съезда дерматовенерологов и косметологов, Екатеринбург. - 2010. - С.10.

10. Махлай Н. С. Исследование чувствительности штаммов *Trichomonas vaginalis* к противопротозойным препаратам / Н. С. Махлай, А. Н. Бочкарёва // Медицинский академический журнал. - 2010. - №10. - С. 88.

11. **Махлай Н. С.** Разработка тест-системы для выявления *Trichomonas vaginalis* методом флуоресцирующих антител / Н. С. Махлай, В. Н. Вербов // Материалы III научно-практической школы-конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора, Оболенск. - 2011. - С. 204-206.

12. **Махлай Н. С.** Разработка и применение тест-системы для определения чувствительности *Trichomonas vaginalis* к противопротозойным препаратам 5-нитроимидазола и 5-нитрофурана / Н. С. Махлай, Л. А. Березина, В. Н. Вербов, А. В. Закревская, А. Б. Жебрун // Журн. микробиол, эпидемиол и иммунол. - 2011. - № 3. - С. 71-75.

13. **Махлай Н. С.** Лабораторные методы диагностики уrogenитального трихомониаза / Н. С. Махлай // Инфекции и иммунитет. - 2011. - №3. - С. 243-248.

14. **Махлай Н. С.** Разработка селективной питательной среды для культивирования *T. vaginalis* / Н. С. Махлай, В. Н. Вербов // Журн. здоровье населения и среда обитания. - 2011. - № 8. - С. 4-7.

15. **Махлай Н. С.** Разработка метода прямой иммунофлуоресценции для выявления *Trichomonas vaginalis* и его место в лабораторной диагностике трихомониаза / Н. С. Махлай, И. И. Денисова, В. Н. Вербов, А. Б. Жебрун // Клин дерматол и венерол. - 2011. - № 6. – С. 14-18.

16. **Makhlay N.** New test for sensitivity evaluation of *Trichomonas vaginalis* to nitroimidazoles and nitrofurans in vitro / N. Makhlay // Book of abstracts of Annual Scientific Meeting Institut Pasteur International Network. Hong Kong, 2010. - P. 124.

Изобретение:

1. Пат. 105744 RU U1 МПК G01N 33/48 Заявка № 2010124024/15 от 11.06.2010. Приоритет изобретения 11.06.2010. Опубликовано 20.06.2011 Бюл. № 17 Страниц 6. Устройство для микробиологических исследований / Вербов В. Н., Махлай Н. С. (RU). Патентообладатель ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (RU).

Список сокращений

ДЭАЭ – диэтиламиноэтил

ДМСО – диметилсульфоксид

ИППП – инфекции, передающиеся половым путем

ИФА – иммуноферментный анализ

КБК – карбонатбикарбонатный буфер

МТЦК – минимальная трихомоноцидная концентрация

5-НИМЗ – 5-нитроимидазол

5-НИТФ – 5-нитрофуран

ПИФ – прямая иммунофлуоресценция

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ФБР – фосфатный буферный раствор

ФИТЦ – флуоресцеин изотиоцианат

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

18S рРНК – 18S рибосомальная РНК