

ЗАОЧНАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

© А.Ю. МИРОНОВ, Н.В. ЗУР, 2013

УДК 616.98:579.882.11]-031:611.63/.65]-078

А.Ю. Миронов, Н.В. Зур

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ УРОГЕНИТАЛЬНОЙ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ (ЛЕКЦИЯ)

ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России

Описаны особенности биологии хламидий. Приводятся современные подходы к лабораторной диагностике урогенитальной хламидийной инфекции, диагностические возможности.

Ключевые слова: хламидийная инфекция, лабораторная диагностика

A.Yu. Mironov, N.V. Zur

THE MODERN APPROACHES TO LABORATORY DIAGNOSTIC OF UROGENITAL CHLAMYDIA INFECTION: A LECTURE

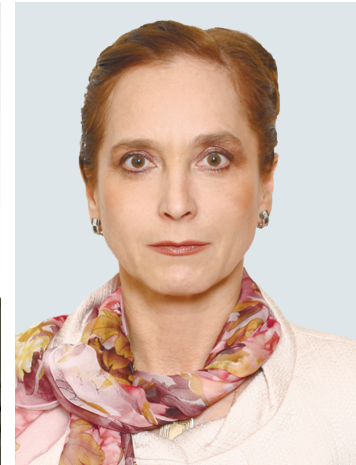
The I.M. Sechenov first Moscow medical university of Minzdrav of Russia, Moscow, Russia

The article considers the characteristics of chlamydia biology. The actual approaches to laboratory diagnostic of urogenital chlamydia infection and corresponding diagnostic possibilities are presented.

Key words: chlamydia infection, laboratory diagnostic

Введение. Урогенитальная хламидийная инфекция является серьезной медико-социальной проблемой для здравоохранения из-за широкого распространения, частого развития осложнений и негативного влияния на репродуктивное здоровье населения. *Chlamydia trachomatis* – облигатный внутриклеточный патоген. Ежегодно она поражает более 90 млн человек, вызывая самую распространенную бактериальную инфекцию, передаваемую половым путем (ИППП). По данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется более 330 млн человек с урогенитальными инфекциями, среди которых число зараженных хламидиями достигает 100 млн человек. Заболеваемость урогенитальным хламидиозом в развитых странах имеет тенденцию к росту. Статистическая регистрация заболеваемости урогенитальным хламидиозом в РФ осуществляется с 1993 г. Она свидетельствует о ежегодном увеличении числа больных. Эпидемическая ситуация в РФ неблагоприятная – регистрируется более 90 случаев урогенитального хламидиоза на 100 тыс. населения, что составляет около 20% в структуре всех ИППП. Частота урогенитального хламидиоза в РФ ежегодно составляет более 1,5 млн человек, при этом в большинстве случаев этиологический диагноз не устанавливается. Истинная заболеваемость превышает данные официальной статистики, имея признаки эпидемии.

Мишенью для *C. trachomatis* служат клетки цилиндрического и переходного эпителия мочеполовых органов, прямой кишки, задней стенки глотки, конъюнктивы, синовиальной оболочки суставов, а также эпителиальные и эпителиоидные клетки различных органов, клетки ретикулоэндотелия, лейкоциты, моноциты, макрофаги. Урогенитальным хламидиозом поражено 40–80% женщин и 20–60% мужчин с инфекционно-воспалительными заболеваниями мочеполовых органов. Урогенитальный хламидиоз протекает без выраженной клинической симптоматики, что существенно затрудняет диагностику и способствует как рас-



пространению болезни, так и раннему развитию осложнений. У 24% мужчин и 70–90% женщин заболевание протекает бессимптомно, при этом хламидийная инфекция выявляется у 25–50% пациенток с воспалительными заболеваниями органов малого таза и у 34% мужчин с эпидидимитом.

У женщин основными клиническими формами хламидийной инфекции являются уретриты и цервициты, а наиболее распространенными осложнениями – воспалительные заболевания органов малого таза, протекающие бессимптомно у 40% больных. Риск бесплодия составляет от 25 до 75% после одного–трех эпизодов воспалительных заболеваний органов малого таза. Существует взаимосвязь хламидийной инфекции со злокачественными образованиями, с развитием дисплазии шейки матки. Хламидии могут являться кофактором, способствующим прогрессированию неопластических процессов.

У мужчин наиболее часто встречающимися формами хламидийной инфекции являются уретрит и простатит. В 20–30% случаев они протекают без выраженных клинических симптомов. Среди осложнений наблюдаются эпидидимиты и орхоэпидидимиты, возникающие у 1–3% больных с хламидийным

Для корреспонденции:

Миронов Андрей Юрьевич, д-р мед. наук, проф. каф. микробиологии
Адрес: 119991, Москва, ул. М. Трубецкая, 8, стр. 2
Телефон: 629-75-79
E-mail: profmironov@mmascience.ru

уретритом с последующим развитием бесплодия. Хламидии способны запускать аутоиммунные процессы в организме, результатом которых может стать болезнь Рейтера и иммунологическое бесплодие. В 25% случаев идиопатическое бесплодие у мужчин с наличием бессимптомной инфекции *S. trachomatis* и отсутствием в анамнезе хламидийной инфекции коррелирует с наличием антиспермальных антител.

Значение урогенитального хламидиоза в патологии человека определяется многоочаговостью поражения не только мочеполовых, но и других органов и систем организма (сердечно-сосудистой, нервной, пищеварительной, дыхательной) вследствие генерализации инфекционного процесса. Особенности таких заболеваний являются скрытое, хроническое течение, несоответствие клинических проявлений морфологическим изменениям в пораженных тканях, а также выраженные дисфункциональные изменения в системе антиинфекционной резистентности организма. Вследствие этого происходит транслокация хламидий и мочеполового тракта в экстраурогенитальные области организма с формированием вторичных очагов инфекции. В настоящее время достаточно хорошо изучены интраканаликулярный, лимфогенный пути распространения хламидий, а также интранатальный при прохождении плода через родовые пути матери. Гематогенное распространение возбудителя наиболее часто наблюдается при заболеваниях, вызванных *S. trachomatis* (урогенитальный хламидиоз, серовары D–K), что доказано на основании выделения инфекционных форм бактерий из сыворотки крови больных урогенитальным хламидиозом. Важным лабораторным диагностическим критерием генерализованной формы хронической хламидийной инфекции является обнаружение хламидий в мазках периферической крови и в лейкоконцентрате венозной крови (рис. 1 и 2). Широкое распространение урогенитальной хламидийной инфекции, разнообразие патологических проявлений, склонность к диссеминированию позволяют рассматривать ее как одну из проблем, следующую по значимости за ВИЧ-инфекцией.

Таксономия и особенности биологии хламидий. Благодаря совершенствованию методов диагностики, накоплению знаний о новых микроорганизмах семейства *Chlamydiaceae*, которое ранее включало только один род *Chlamydia*, согласно современной классификации разделено на два рода: *Chlamydia* и *Chlamydophila*. Новое определение порядка *Chlamydiales* предложено на основании филогенетического анализа генов 16S и 23S рРНК, подтвержденного данными о генетических и фенотипических признаках (рис. 3; см. таблицу).

Возбудитель урогенитального хламидиоза – *Chlamydia trachomatis* (семейство *Chlamydiaceae*, род *Chlamydia*), обладает рядом особенностей, важных с точки зрения лабораторной диагностики этой инфекции. *S. trachomatis* – облигатный внутриклеточный паразит, который не способен размножаться вне клеток организма-хозяина, не растет на питательных средах, культивируется в желточном мешке куриных эмбрионов. Хламидии имеют уникальный цикл развития, протекающий в цитоплазме клеток организма с использованием ферментов клетки-хозяина; хламидии не способны самостоятельно синтезировать АТФ, являясь энергетическими паразитами. Имеются данные о том, что хламидии могут синтезировать АТФ, хотя и в незначительных количествах, путем гликолиза и расщепления гликогена.

Главной особенностью хламидий является уникальный внутриклеточный цикл развития, который включает три различные формы существования возбудителя (рис. 4). Элементарное тельце – экстрацеллюлярная, высокоинфекционная форма возбудителя размером 250–300 нм, адаптированная к внеклеточному существованию, не способная к размножению. Элементарное тельце обеспечивает диссеминацию в клетке или проникновение в другую чувствительную клетку. Ретикулярное тельце – интрацеллюлярная, неинфекционная форма репродукции размером до 1000 нм, которая обеспечивает продолжительность инфекции, «выживание» за счет строгой внутриклеточной локализации (рис. 5). Аберрантные тельца – форма латентности, не поддающиеся культивированию, определяющие персистенцию

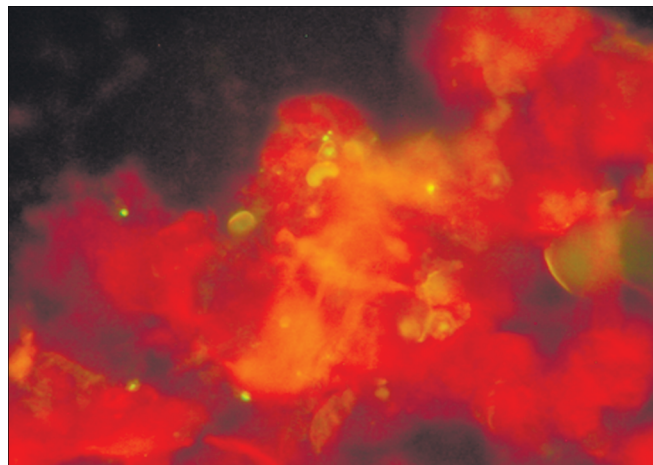


Рис. 1. Хламидии в крови.

инфекции благодаря нарушенному иммунному ответу. Аберрантные тельца морфологически и антигенно отличаются от элементарных и ретикулярных телец. Они в 10–100 раз более крупные и характеризуются сниженным уровнем синтеза основных компонентов наружной мембраны (главный белок наружной мембраны и липополисахариды – ЛПС). Синтез стрессового белка теплового шока, обеспечивающего внутриклеточное выживание хламидий, поддерживается на достаточно высоком уровне. Вследствие почти 50% гомологии с аминокислотным составом такого же белка человека в организме может усиливаться образование аутоантител. Проникновение хламидий в клетки происходит через трансмембранные каналы, которые содержат высокоаффинные участки связывания и облегчения транспорта веществ, в том числе при эндоцитозе элементарных телец. На поверхности клеток находится N-ацетил-нейраминавая кислота, которая взаимодействует с элементарными тельцами менее вирулентных штаммов хламидий. Элементарное тельце эффективнее взаимодействует с клетками, специфически обедненными данными рецепторами. При поглощении элементарных телец в результате пиноцитоза наблюдается специфическое взаимодействие рецепторов плазматической мембраны с лигандами хламидий, что играет главную роль в процессе инфицирования монослоя клеток *in vitro* слабовирулентными штаммами, так как высоковирулентные штаммы могут эффективно проникать посредством фагоцитоза. Фагоцитоз клеток инициируется взаимодействием паразита и хозяина, которое включает поверхностный заряд гидрофобность поверхности клетки хламидий и клетки-хозяина.

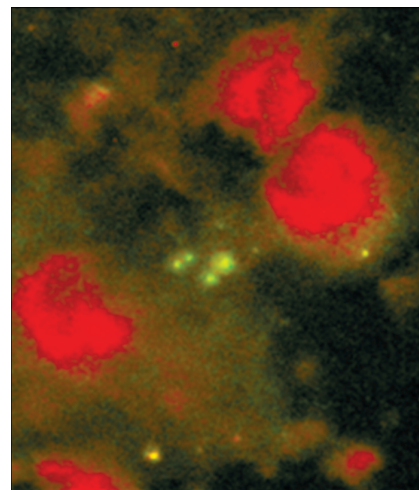


Рис. 2. Хламидии в лейкоконцентрате.

Хламидии имеют сложную антигенную структуру. Выделяют родоспецифический, видоспецифический и сероварспецифический антигены. В клеточной стенке содержатся термостабильные ЛПС, являющиеся родоспецифическими антигенами хламидий. Эпитоп, определяющий родоспецифичность, расположен в углеводном участке и представлен трехмономерным олигосахаридом (3-деокси-D-манно-октулозоновая кислота). Антигенные детерминанты видо- и типоспецифических антигенов термолабильны, белковой природы, локализованы в различных участках белков наружной мембраны – Outer membrane proteins (Omp). Белки наружной мембраны хламидий – обогащенные цистеином белки Omp 1, Omp 2 (Omc B), Omp 3 (Omc A). Ригидность клеточной стенки хламидий обусловлена наличием множественных дисульфидных поперечных связей между этими белками. Примерно 60% общей массы мембранных белков составляет главный структурный белок наружной мембраны мол. массой 40 кД, формирующий поры мембраны, Omp 1 или MOMP. Остальные антигены наружной мембраны представлены богатыми цистеином белками наружной мембраны второго типа с мол. массой 60 кД. Белки MOMP и Omp 2 содержат видо- и типоспецифические эпитопы.

Белок MOMP – антиген *C. trachomatis*, определяющий серовар. Он содержит 4 варибельных домена – VD₁, VD₂, VD₃, VD₄ (variable domain), в которых расположены главные видо- и типоспецифические антигены. Сероварспецифические участки локализованы преимущественно в VD₂ и VD₄. При рекомбинации в этих участках изменяется антигенная структура *C. trachomatis* и они становятся “невидимыми” для антител. Возбудителями урогенитального хламидиоза являются серовары D–K *C. trachomatis*.

MOMP *C. trachomatis* представлен в элементарных и ретикулярных тельцах. Структура данного белка различается в этих формах хламидий. Элементарные тельца содержат большое количество MOMP с перекрестными дисульфидными связями и богаты цистеином белки массой 60, 125 и 15 кД. Это определяет форму и осмотическую стабильность элементарных тельц. В нестабильных ретикулярных тельцах MOMP не имеет перекрестных связей и богаты цистеином белки синтезируются и встраиваются в наружную мембрану клеточной стенки хламидий на завершающих этапах цикла развития. MOMP является порином и адгезином и экспрессируется во всех фазах развития хламидий. Периплазматический насыщенный цистеином белок Omp 2 (Omc B) массой 60 кД присутствует только в мембране элементарных тельц. Он участвует в процессе прикрепления и взаимодействия с клетками организма, обуславливает вирулентность хлами-

Серовары патогенных хламидий

Семейство Chlamydiaceae				Заболевания человека
род	виды	биовары	серовары	
Chlamydia	<i>C. trachomatis</i>	Trachoma	A, B, Ba, C	Трахома и паратрахома
			D, E, F, G	Урогенитальный хламидиоз
			H, I, J, K	Конъюнктивит, пневмония новорожденных, болезнь Рейтера
Chlamydophila	<i>C. psittaci</i>	–	LGV	Венерическая лимфогранулема
			8 сероваров	Орнитоз
			TWAR	ОРЗ, пневмония
			Coala	Бронхиальная астма
		Quine		Атеросклероз

дий. Omp 3 (Omc A) белок 12 кД – гидрофильный липопротеин, сходный по структуре с муреиновыми липопротеидами грамотрицательных бактерий. В наружной мембране клеточной стенки хламидий имеется 9 полиморфных белков (Pomp), которые участвуют во взаимодействии хламидий с защитными механизмами клетки-хозяина. Данные протеины (Omp 3, Pomp) синтезируются в течение поздней фазы цикла развития и включаются в мембрану хламидий в процессе трансформации ретикулярных тельц в элементарные тельца. Структурным белком клеточной стенки хламидий является термостабильный белок теплового шока (hsp) 60 кД, который относится к основным антигенам. Функции белка теплового шока – участие в разворачивании, свертывании и трансляции других белков, в сборке и разборке белковых комплексов в эндоплазматической сети и митохондриях. Белок теплового шока активирует лимфоциты CD4 и CD8. IgA к белку теплового шока хламидий доминируют у женщин с первичным бесплодием и с повторяющимися спонтанными абортми. Наличие высоких титров противохламидийных IgG, в особенности антител к hsp 60, в сыворотке крови человека не только не обеспечивает защиту от инфекции, но и ассоциируется с осложнениями заболевания и развитием хронической персистирующей инфекции. Присутствие антител к hsp a 60 *C. trachomatis* связывают с развитием перигепатитов и спаечного процесса.

Геном *C. trachomatis* состоит из 1000 пар нуклеотидов (п. н.) Он содержит 9 генов Pomp и представлен двухцепочечной молекулой ДНК, на 44% состоящей из G+Ц, с мол. массой 660 • 10⁶. В зараженных клетках присутствуют транскрипты этих генов Pomp. Неизвестно, происходит ли синтез всех 9 мембранных белков. Большое количество генов Pomp является источником антигенной изменчивости хламидий. Почти все штаммы *C. trachomatis* содержат дополнительный генетический материал. Это плазида, имеющая в составе 7,5 тыс. п. н. Выявление последовательности нуклеиновых кислот используется в целях диагностики (ПЦР, лигазная цепная реакция – ЛЦР). Плазида является отличной диагностической мишенью, но может отсутствовать у 1–16% клинических изолятов хламидий, вызывающих урогенитальную инфекцию. В таких случаях ПЦР-тест-системы, используемые для выявления внехромосомной ДНК, дают ложноотрицательный результат. Для дифференциации и идентификации штаммов *C. trachomatis* друг от друга и от других видов используют варибельные области в рибосомальных последовательностях ДНК, спейсорную область 16S–23S рРНК или ген MOMP, Omp 2.

Лабораторная диагностика урогенитального хламидиоза. Единственным достоверным критерием наличия урогенитального хламидиоза являются результаты лабораторных исследований. Успешная организация борьбы с уро-

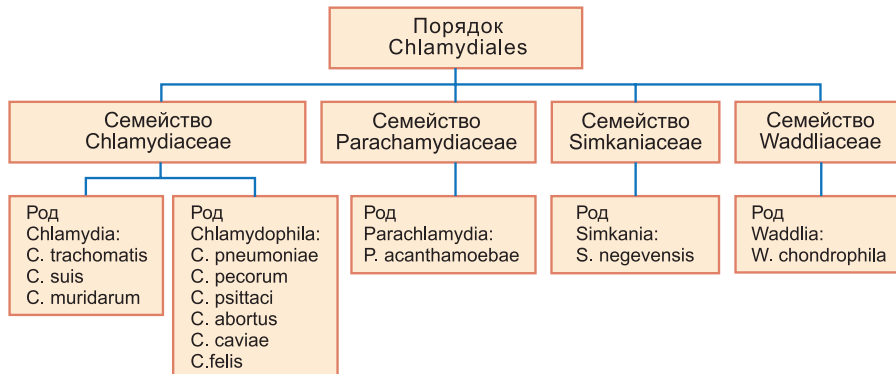


Рис. 3. Современная таксономия хламидий.

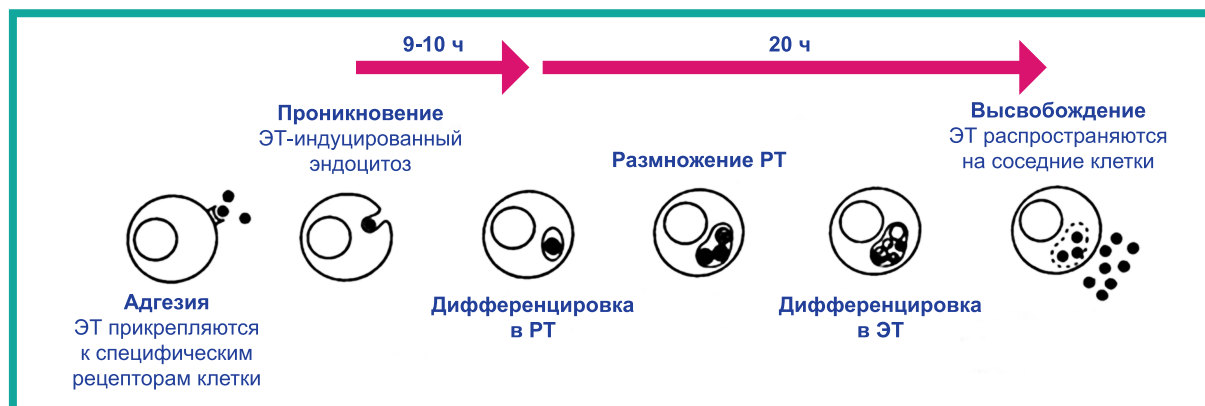


Рис. 4. Схема репликативного цикла хламидий.
ЭТ – элементарное тельце, РТ – ретикулярное тельце.

генитальным хламидиозом возможна лишь при условии его своевременного и полного выявления. Решающее значение в постановке диагноза приобретают методы лабораторной диагностики. Важность диагностики хламидийной инфекции отражена в приказах Минздрава России: № 281 от 07.12.1993 г. «О совершенствовании контроля за заболеваниями, передаваемыми половым путем (ЗППП)» и № 64 от 21.02.2000 г. «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований». На основании этих приказов введена обязательная диагностика хламидиоза у больных с впервые установленным диагнозом ИППП, описаны методы лабораторной диагностики хламидиоза, определены показания к ее проведению и интерпретация полученных результатов с клинической точки зрения; предложен комплекс противоэпидемических и лечебных мероприятий.

Не существует единого алгоритма диагностического обследования пациентов с подозрением на хламидиоз, в том числе на генерализованные формы урогенитальной хламидийной инфекции. Диагноз «генерализованная форма хламидийной инфекции» основывается на данных анамнеза, клинической картине (наличие общей инфекционной интоксикации, персистирующей лимфоаденопатии, катарального синдрома, офтальмохламидиоза, синдрома поражения мочеполовых органов, сердечно-сосудистой, нервной систем и др.) и подтверждается результатами лабораторных исследований. Важным диагностическим критерием является обнаружение хламидий в крови.

Это обусловлено высокой зависимостью результатов диагностики от выбора соответствующего метода лабораторного

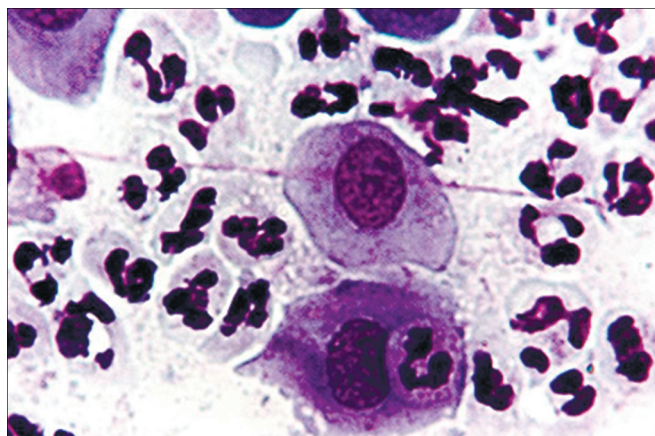


Рис. 5. Внутриклеточные включения хламидий -- ретикулярные тельца.
Окраска по Романовскому--Гимзе.

исследования, правильной подготовки пациента к исследованию, правильного взятия клиницистом биоматериала для исследования из первичных и вторичных очагов хламидийного поражения, правильной предварительной подготовки забранного биоматериала и своевременного проведения исследования, правильного хранения и доставки биоматериала на исследование, а также от материально-технического обеспечения лаборатории и уровня квалификации медицинского персонала.

При обследовании пациентов с целью диагностики урогенитальной хламидийной инфекции определяют симптомы и признаки инфекции, вызванной *S. trachomatis*; проводят также скрининг, или обследование лиц группы риска.

Для диагностики урогенитального хламидиоза используют микробиологические методы, которые можно подразделить на методы прямой детекции хламидий (выделение чистой культуры хламидий, цитологическое исследование мазков, РИФ, молекулярно-биологические методы) и непрямые методы выявления *S. trachomatis* (серодиагностика, иммунохроматографический и ферментспецифический методы).

Золотым стандартом лабораторной диагностики урогенитального хламидиоза является культуральный метод. Он заключается в заражении культуры клеток клиническим материалом, полученным от больного. Используются культуры клетки McCoу, PL, HeLa-920, Hep-2, BGMK, мышинных фибробластов L-929, обработанные антимаболизитами, цитостатиками. Через 48–72 ч соответственно циклу развития хламидий клетки фиксируют, обрабатывают красителями. Результаты оценивают под микроскопом по наличию специфических внутриклеточных хламидийных включений методом прямой или непрямой РИФ. Используют моноклональные или поликлональные флюоресцирующие антитела к хламидиям. При отрицательном результате рекомендуется произвести новый посев материала. В случае выявления хотя бы одного цитоплазматического включения, имеющего специфическое окрашивание, форму и структуру, можно констатировать наличие хламидий в исследуемом образце. Для повышения эффективности адсорбции и проникновения хламидий в клетки применяют различные поликатионы (DEAE – декстран-диэтиламиноэтилдекстран) для обработки монослоя клеток перед заражением. Культура клеток и наружная мембрана хламидий отрицательно заряжены. Поликатионы нейтрализуют анионную поверхность хламидий, создавая условия для контакта. После заражения в питательную среду добавляют антимаболизиты (циклогексимид, L-цистеин гидрохлорид, гидрокортизон, колхицин), которые ингибируют метаболизм культуры клеток, но не влияют на хламидии, и косвенным путем стимулируют их репродукцию. Чаще всего хламидии культивируют на культуре клеток McCoу, обработанных циклогексимидом. Для подавления роста сопутствующей микрофлоры в питательную среду добавляют антибиотики и антимаболизиты в дозах, которые не ингибируют размножение хламидий и не обладают токсичностью для культуры клеток.

Вирулентность и инфекционность хламидий увеличивается при центрифугировании монослоя клеток с инокулируемым материалом. Культуральный метод позволяет определять чувствительность изолированных штаммов хламидий к антибиотикам и обнаруживать штаммы, не содержащие плазмиду. Отсутствуют четкие критерии определения штамма, чувствительного или устойчивого к данному антибиотику, поскольку системы *in vitro* не учитывают роль иммунной системы в элиминации патогена. Культуральный метод – самый трудоемкий и дорогостоящий, достаточно длительный (3–14 сут), требующий соблюдения строгих правил транспортировки клинического образца, температурного режима, наличия высококвалифицированного медицинского персонала. По специфичности (100%) данный метод является эталонным, однако его чувствительность может варьировать от 33 до 85%. Для диагностики урогенитального хламидиоза рекомендуется изолировать культуры как из уретры, так и из цервикального канала, что позволяет увеличить на 5% выделение хламидий. При неактивном хламидиозе, когда в неразвивающихся ретикулярных тельцах хламидий приостанавливаются метаболические процессы, в культуре клеток можно получить ложноотрицательные результаты. С этим связаны трудности диагностики хронической персистирующей хламидийной инфекции. При хронической восходящей инфекции, вызванной *C. trachomatis*, а также при взятии у пациента с хламидиозом материала с низким количеством жизнеспособных бактерий частота выявления хламидий невелика.

Цитологический метод диагностики урогенитального хламидиоза наиболее прост и доступен. Он дает общее представление о цитологической картине, морфологии клеток из очага поражения, наличии бактерий, грибов, простейших. Специфические морфологические признаки позволяют определить наличие хламидий в препарате. Наиболее распространенными методами окраски препаратов является окраска по Романовскому–Гимзе, Маю–Грюнвальду–Гимзе, по Маккиавелло, по Папаниколау, раствором Люголя. При окраске по Романовскому–Гимзе включения хламидий выявляются как округлые или овоидные структуры, состоящие из красно-фиолетовых элементарных и сине-фиолетовых ретикулярных телец. В препаратах можно оценить морфофункциональное состояние лимфоцитов и нейтрофилов. Наличие в препарате телец Хальберштерера–Провацека подтверждает диагноз хламидиоза, однако их отсутствие не исключает наличия возбудителя. На частоту обнаружения включений существенное влияние оказывают характер течения инфекционного процесса, качество исследуемых соскобных препаратов. Чувствительность метода составляет 10–15%, специфичность – 10–30%. Цитологический метод неприменим для скрининговых исследований. Диагностическая значимость цитологического метода достаточно низкая: у мужчин верифицировать хламидийную инфекцию удается лишь в 10–15% случаев, а у женщин в соскобах из цервикального канала – в 30–40%. При правильном взятии материала у больных (со слизистых влагалища и шейки) и при соответствующей высокой квалификации врача диагностическая значимость световой микроскопии для обнаружения хламидий не уступает прямой РИФ и превосходит ИФА.

Методы, в основе которых лежат реакции иммунитета, позволяют обнаруживать в биологическом материале (моча, мочекрот, соскоб из уретры, цервикального канала, ротоглотки, эякулят, сок предстательной железы, сыворотка крови, лейкоконцентрат, мазки периферической крови, суставная жидкость) наличие либо родо- или видоспецифического антигена – РИФ, либо специфических антител к хламидиям классов IgA, IgM, IgG – ИФА.

РИФ позволяет обнаруживать антигены хламидий (ЛПС, МОМР, рекомбинантные антигены) в эпителии и других тканях моноклональными или поликлональными антителами. Чувствительность РИФ зависит от качества используемых люминесцирующих антител. При производстве антител для «РекомбиСлайдХламидия» российского предприятия НПФ ЛАБ-диагностика используется первый в России созданный с по-

мощью генной инженерии рекомбинантный белок хламидий, который состоит из видоспецифических эпитопов (к МОМР) поверхностного антигена *C. trachomatis*. При использовании моноклональных антител окрашиваются преимущественно элементарные тельца хламидий и в меньшей степени ретикулярные тельца. Применение поликлональных хламидийных антител позволяет выявлять все формы хламидий: элементарные, ретикулярные тельца, цитоплазматические включения, персистирующие, переходные. Кроме импортных наборов («Chlamyset», Финляндия; «Syva Micro Trak», США) появились и широко применяются отечественные моноклональные антитела («ХлаМоноСкрин», «ХлаМоноСкрин-2»). По данным наших собственных исследований, накопленным в течение 10 лет, набор поликлональных антител «РекомбиСлайд-Хламидия» позволяет более качественно обнаруживать все формы *C. trachomatis* на разных стадиях их развития.

Существует два варианта постановки РИФ – прямой и непрямой. В первом случае специфическое антитело мечено флюорохромом, и реакция проходит в один этап. Во втором случае специфическое антитело не имеет метки, и для выявления образовавшегося на первом этапе комплекса антиген–антитело используют меченые антитела, специфичные к антихламидийным антителам. Результат РИФ оценивают под люминесцентным микроскопом с использованием масляной или водной иммерсии. Водная иммерсия дает более ровное, яркое и четкое свечение. Результат положительный, если препарат содержит клетки эпителия и удается обнаружить не менее 5–10 ярко-зеленых флюоресцирующих элементарных телец (рис. 6 и 7).

Прямой и непрямой варианты РИФ широко применяются для диагностики урогенитального хламидиоза. Однако их применение сдерживается тем, что их специфичность и чувствительность находятся в пределах 85–99 и 50–90% соответственно. Это связано с тем, что специфические антитела, выпускаемые разными фирмами, различаются по качеству. Помимо жестких требований к качеству самих тест-систем, важное значение для получения достоверных результатов имеют подготовка пациентов к исследованию, качество взятия биоматериала для исследования, дальнейшая его обработка и хранение. Необходимо наличие высококвалифицированных специалистов по люминесцентной микроскопии, т. е. результат зависит от профессионализма врача клинической лабораторной диагностики. Только при корректном исполнении опытным врачом-лаборантом РИФ может быть очень чувствительной и высокоспецифичной. Использование прямого варианта РИФ целесообразно для диагностики в группах высокого риска по урогенитальному хламидиозу, особенно у пациентов с клиническими проявлениями ИППП, и не оправданно для выявления антигена *C. trachomatis* в группах низкого риска, в том числе подлежащих скрининговому обследованию. При сравнении ПЦР-тест-системы («Amplior», Roche) с прямой РИФ для выявления *C. trachomatis* в уретральных и цервикальных образцах в основном с низким содержанием элементарных телец установлено, что чувствительность РИФ в 10 раз выше, чем ПЦР. Диагностическая информативность прямого метода РИФ связана с его способностью выявлять не только корпускулярные, но и растворимые антигены хламидий. Необходимо обращать особое внимание на качественную оценку результатов исследования. Показатели метода менее зависят от изменения тинкториальных свойств хламидий в процессе инфекции, особенно при этиотропной терапии.

ИФА основан на выявлении родоспецифического ЛПС хламидий. ИФА удобен для скрининговых исследований, поскольку возможна приборная и объективная регистрация результатов анализа. Чувствительность и специфичность ИФА составляет 20–98 и 80–99% соответственно. На рынке диагностических тест-систем в настоящее время предлагается большое количество наборов ИФА зарубежных и отечественных производителей. При хронической инфекции, особенно при персистенции хламидий, вероятность детекции возбудителя невелика, что часто приводит к ложноотрицательным результатам. ИФА преимущественно определяет наличие и титр в сыворотке крови

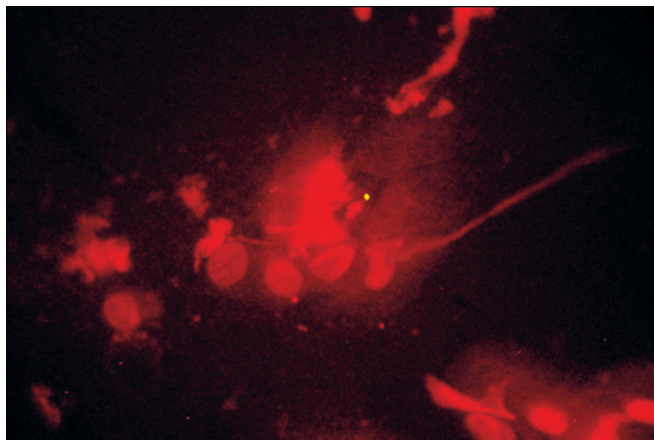


Рис. 6. Хламидии в соскобе эпителиальных клеток уретры.

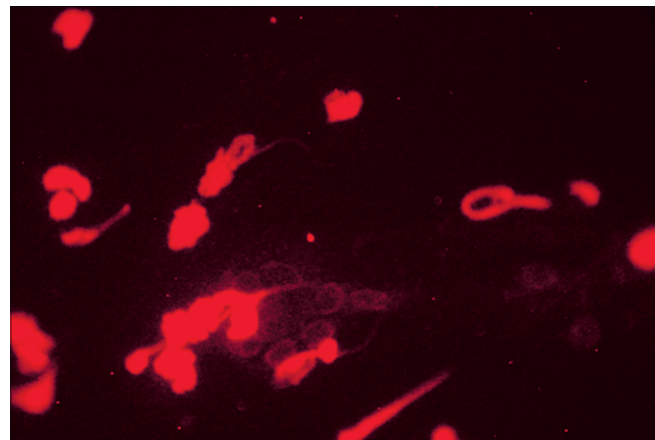


Рис. 7. Хламидии в соскобе клеток цервикального канала.

антител к хламидиям – IgM, IgA, IgG, что перспективно при определении стадии и характера течения болезни. Наиболее часто ложноположительный результат ИФА встречается при определении специфических антител класса IgM и может быть обусловлен наличием ревматоидного фактора, физиологической гиперпродукцией IgM при беременности, перекрестной реакцией с антигенами других возбудителей, аутоиммунным процессом, нарушением обмена веществ.

Антигены хламидии обладают слабой иммуногенностью, вследствие чего выработка и накопление антител в организме происходят в малых количествах. Лучше всего брать кровь для исследования в период обострения заболевания. Это позволяет обнаруживать антитела к хламидиям лишь у 55–65% больных при наличии в 2–5% случаев ложноположительных результатов. Титр антител зависит как от иммунореактивности организма, так и от скорости их элиминации. Постановка диагноза хламидиоза по единичному анализу возможна лишь при наличии высокого титра антител к хламидиям преимущественно класса IgM. IgM в сыворотке крови является ранним маркером инфекции. Они определяются через 5 дней после начала заболевания и полностью исчезают через 2–3 мес независимо от проведенного лечения. Секреторный IgA синтезируется в месте входных ворот инфекции – сначала его выявляют в эякуляте и вагинальном отделяемом. В сыворотке крови IgA появляются через 10–14 дней после начала заболевания, обычно параллельно с появлением IgG, но на более низком уровне и свидетельствуют о прогрессировании заболевания. Уровень IgA обычно снижается ко 2–4-му месяцу в результате успешного лечения, при реинфекции его титр вновь возрастает. IgA является маркером как острой формы, так и манифестации при хронической форме инфекции. В течение короткого периода в сыворотке могут присутствовать одновременно IgM и IgA. Определение IgA более информативно в качестве маркера активной стадии хламидийной инфекции или при мониторинге эффективности лечения, так как данные антитела имеют небольшой период полураспада. В этот же период или чуть позже могут быть выявлены IgG. Они определяются через 15–20 дней после начала заболевания. После перенесенной инфекции IgG могут определяться в низком титре в течение многих лет. При реинфекции или реактивации наблюдается заметное увеличение титра IgG, который у нелеченых пациентов сохраняется неизменным. Высокий титр IgG к хламидиям диагностически важен при хронических или системных инфекциях. Для оценки течения заболевания и эффективности проводимой терапии лучше исследовать парные сыворотки. Дву-, трехкратное снижение титра антител указывает на адекватность и эффективность проводимых лечебных мероприятий. Четырехкратная сероконверсия свидетельствует об обострении или прогрессировании заболевания. Для верификации персистирующей хламидийной инфекции целесообразна постановка ИФА не только на наличие антител классов IgA, IgM, IgG, но и для определе-

ния IgG к белку hsp 60 хламидий. Несмотря на трудность интерпретации в ряде случаев, ИФА имеет большое значение при эпидемиологических обследованиях пациентов, относящихся к группам повышенного риска заражения, особенно в экономически отсталых странах.

Молекулярно-биологические методы диагностики, основанные на выявлении ДНК или РНК хламидий, в последние годы заняли место золотого стандарта, которое ранее принадлежало культуральному методу.

Разработаны методы гибридизационного анализа на основе меченых ДНК/РНК-зондов. В качестве гибридизационных зондов используют фрагменты ДНК, полученные путем клонирования в плазмидных или фаговых векторах специфических участков исследуемых объектов, а также искусственно синтезированные одноцепочечные олигонуклеотиды (преимущественно ДНК), последовательность которых комплементарна определенному видоспецифическому участку генома возбудителя. Чувствительность и специфичность метода составляет 70–85 и 80–95% соответственно. Его преимуществом является возможность тестирования большого количества образцов, быстрота, автоматизация, может применяться только для анализа образцов, полученных инвазивными методами (из шейки матки, уретры).

ДНК-диагностика основана на комплементарном взаимодействии нуклеиновых кислот, которое позволяет с высокой точностью идентифицировать последовательность нуклеотидов в генах искомого микроорганизма. Из многочисленных модификаций данного метода следует выделить ПЦР, получившую наибольшее распространение. В основе ПЦР лежит многократное копирование (амплификация) определенного фрагмента ДНК, который является маркерным для данного возбудителя. С помощью ПЦР можно обнаружить плазмидную ДНК *C. trachomatis*, фрагменты хромосомной ДНК, кодирующие МОМР, рибосомальную РНК и др. В результате амплификации может образоваться 1 млрд копий ДНК-мишени, которые обнаруживаются либо с помощью электрофореза в геле, либо методом гибридизации со специфичным зондом с последующим выявлением гибридов в ИФА. К преимуществам ПЦР относятся высокая чувствительность (70–95%) и специфичность (97–99%), а также возможность исследования большого числа образцов. С помощью ПЦР возможно получение практически неограниченных количеств специфической ДНК. ПЦР применяется для выявления ДНК хламидий и для типирования штаммов. Низкое качество реагентов для ПЦР является причиной невоспроизводимости результатов, обусловленной инактивацией наиболее лабильных реагентов тест-систем (праймеры, ДНК-полимераза); неадекватно выбранной генетической мишенью. Считалось, что самыми чувствительными диагностическими системами для ПЦР являются те, которые ориентированы на детекцию плазмиды, поскольку каждая клетка *C. trachomatis* содержит 10–20 ко-

пий плазмидной ДНК. Но у некоторых клинических изолятов количество бесплазмидных штаммов *S. trachomatis* варьирует от 1 до 16%, что означает большую вероятность ложноотрицательных результатов, проверить которые в лаборатории практического здравоохранения проблематично. Для достижения высокой чувствительности и специфичности в качестве мишени используют консервативные внутри вида фрагменты главных антигенов, не гомологичные родственным генам других видов. Идеальной мишенью оказался ген *Kdo*-трансферазы (*gse A*), кодирующий фермент, принимающий участие в синтезе одного из основных родоспецифических компонентов ЛПС. Установлена высокая специфичность этой тест-системы при относительно низкой чувствительности, что не позволило использовать ее для диагностики хламидиоза. ПЦР может использоваться как с инвазивными (шейка матки, уретра), так и с неинвазивными образцами (моча, биоматериал из области вульвы и влагалища). Чувствительность при исследовании вагинальных проб методом ПЦР может быть низкой (53–73%). При скрининговых эпидемиологических исследованиях этот материал также может быть использован.

Качество ПЦР-диагностики зависит от специфичности праймеров, строгого соблюдения технологического режима, квалификации исследователя. Возможно получение ложноположительных результатов вследствие некачественно подобранных праймеров или ложноотрицательных результатов из-за ингибирования реакции. ПЦР не требует сохранения жизнеспособности возбудителя, однако необходимо соблюдать строгие требования к условиям транспортировки клинического материала, особые нормативы для предупреждения контаминации лаборатории, что может существенно повлиять на результат анализа. Следует учитывать высокую стоимость исследования, обусловленную дороговизной качественных праймеров для ПЦР-диагностики, и высокую стоимость лабораторного оборудования, что ограничивает применение ПЦР в широкой лабораторной практике. Помимо ПЦР на основании методов амплификации нуклеиновых кислот созданы разнообразные альтернативные технологии – ЛЦР (LCR – ligase chain reaction), NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), TMA (Transcription-Mediated Amplification), SDA (Strand Displacement Amplification) и другие, с помощью которых выявляют *S. trachomatis*.

ЛЦР – другой метод амплификации ДНК, разработанный для выявления *S. trachomatis*. В его основе лежит легирирование олигонуклеотидов, комплементарных определенной ДНК-мишени. В этом быстром и высокочувствительном методе используется способность ДНК-лигазы соединять две пары комплементарных олигонуклеотидов после их гибридизации *in vitro*, что выявляется с помощью анализатора. ЛЦР, как и ПЦР, может использоваться для анализа уретральных, эндоцервикальных образцов и проб мочи, при этом отмечается повышенная чувствительность определения *S. trachomatis* в моче у женщин.

Амплификация с применением QВ-репликазы, копирующая РНК-матрицу (Gene Trak), основана на внедрении одноцепочечного олигонуклеотидного зонда в молекулу РНК, которая может быть амплифицирована экспоненциально после гибридизации мишени ферментом QВ-репликазой. В NASBA – амплификация нуклеиновых кислот на основе сиквенса – амплифицируется РНК при одновременном использовании ферментативной активности обратной транскриптазы вируса миелобластома птиц, РНКН, Т7РНК-полимеразы в изотермальных условиях. ТМА (Gen-Probe) – транскрипционная амплификация, основанная на применении амплификации с помощью транскрипции и гибридизации для качественного определения рибосомальной РНК *S. trachomatis* в исследуемых пробах (мишенями являются гены 16S рРНК). Использование двух праймеров и двух ферментов дает возможность транскрипции ДНК и последующих РНК ампликонов в изотермальных условиях. На основе изотермической реакции аналогично ТМА и NASBA, однако с использованием в качестве мишени молекулы ДНК, созданы методы амплификации со смещением или вытеснением цепи (SDA). На основе этой

методики фирма Becton Dickinson (США) выпускает приборы и тест-наборы для детекции *S. trachomatis* и *N. gonorrhoeae*.

Для экспресс-диагностики хламидиоза используются иммунохроматографические и ферментспецифические методы. Иммунохроматографические методы основаны на образовании комплекса антиген–антитело–цветной латекс, который формирует окрашенную зону на нитроцеллюзном фильтре. В основе метода Chlamydia STA-ПАК лежит комбинация коньюгата моноклональных антител и коллоидного золота с поликлональными антителами, иммобилизованными на твердой фазе, что позволяет идентифицировать ЛПС хламидий. Оценка теста происходит по характерному окрашиванию в лунке плашки; чувствительность метода 87,5%. Ферментспецифические тесты заключаются в расщеплении синтетического субстрата пептидазой хламидий и пурпурном окрашивании под действием хромогена продукта реакции непосредственно на тампоне с клиническим образцом. Оба теста скрининговые, обладают относительно невысокой (50–60%) чувствительностью, зато простые и быстрые.

Для верификации урогенитальной хламидийной инфекции предложен и опробован новый метод диагностики – реакция специфического лейкоцитолита, основанная на определении в крови высокого показателя разрушения лейкоцитов у больных урогенитальным хламидиозом. Реакция специфического лейкоцитолита обладает высокой чувствительностью (100%) и может быть использована в качестве подтверждающего теста в комплексной диагностике урогенитальных заболеваний.

Важным звеном в комплексе клинико-лабораторных мероприятий при урогенитальном хламидиозе является оценка эффективности проводимой терапии – применение лабораторных тестов для установления критерия излеченности. Главным надежным методом установления эффективности проведенного лечения является культуральный метод (через 14 дней после окончания антибактериальной терапии). Адекватными и доступными способами контроля излеченности хламидийной инфекции являются прямая РИФ и ПЦР, выполненные соответственно не ранее чем через 2 нед и через 30–40 дней после окончания терапии. Сочетание различных диагностических методик существенно повышает эффективность и надежность контроля терапии урогенитального хламидиоза.

Заключение. В настоящее время отсутствует не только единый алгоритм обследования больного с подозрением на урогенитальную хламидийную инфекцию, особенно на распространенную форму урогенитальной хламидийной инфекции с затяжным, рецидивирующим характером течения заболевания, но и единое мнение о трактовке полученных результатов. Для достоверной верификации возбудителя при генерализованной хламидийной инфекции необходимо расширять перечень исследуемых клинических образцов, полученных не только из урогенитального тракта больных, но также из других органов и систем. Важным диагностическим критерием при этом является обнаружение хламидий в крови, что позволяет объективно диагностировать распространенную форму урогенитальной хламидийной инфекции.

При хламидийной инфекции отсутствуют специфические клинические симптомы, поэтому методы лабораторной диагностики играют ведущую роль в постановке этиологического диагноза. Проблема диагностики хронических генерализованных форм хламидийной инфекции определяется рядом факторов. Во-первых, персистирующие формы хламидий, ответственные за развитие хронических инфекций, очень трудно верифицировать микробиологическими методами вследствие изменений метаболизма и антигенной структуры. Во-вторых, при осложненной восходящей и экстрагенитальной инфекции возбудитель малодоступен для анализа. В-третьих, иммунный ответ при хронической хламидийной инфекции подавлен, что ограничивает возможность использования серодиагностики.

Путем многолетних научно-прикладных исследований создана основа лабораторных методов диагностики урогенитального хламидиоза, позволяющая в большинстве случаев достоверно устанавливать наличие возбудителя, динамику вос-

палительного процесса, эффективность проводимой терапии и критерия излеченности. Выбор метода исследования и способ оценки результатов при диагностике урогенитального хламидиоза имеют важное значение. Ни один из существующих методов диагностики урогенитальной хламидийной инфекции не является оптимальным. Золотым стандартом является грамотный и комплексный подход к диагностике хламидиоза – подтверждение наличия возбудителя двумя или тремя различными методами. Будущее в диагностике хламидиоза принадлежит ПЦР, особенно ПЦР в реальном времени и NASBA в реальном времени, которые могут быть использованы в качестве арбитражного подтверждающего теста и для контроля излеченности.

Разработка современных, недорогих, высокочувствительных и специфичных методов лабораторной диагностики урогенитального хламидиоза на основе механизмов распространения патогена в организме при хроническом течении инфекции приобретает особую актуальность и имеет огромное значение для медицинской науки и практического здравоохранения.

Вопросы для самоконтроля:

1. Какой материал следует брать на исследование при подозрении на урогенитальную хламидийную инфекцию?
2. Какой метод микробиологической диагностики является золотым стандартом в диагностике урогенитальной хламидийной инфекции?
3. Какие реакции иммунитета используются при серологической диагностике урогенитальной хламидийной инфекции?
4. Какие молекулярно-биологические методы применяются в клинической лабораторной диагностике урогенитальной хламидийной инфекции?
5. Каковы основные причины появления ложных результатов ПЦР при урогенитальной хламидийной инфекции?
6. Назовите методы прямой детекции хламидий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зур Н.В., Миронов А.Ю. Современные методы лабораторной диагностики урогенитальной хламидийной инфекции. Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2010; 2: 33–42.
2. Воробьев А.А., ред. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник. 2-е изд. испр. и доп. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2012.
3. Меншиков В.В. Руководство по клинической лабораторной диагностике. М.: Медицина, 1982.
4. Молочков В.А. Урогенитальный хламидиоз. – М.: «Издательство БИНОМ», 2006.
5. Караулов А.В., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Лапин Б.А., ред. Хламидийная инфекция. Новые аспекты патогенеза, иммунологии, верификации и лечения инфекции у человека и приматов. М.: Издательство Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, 2012.

REFERENCES

1. Zur N.V., Mironov A.Ju. Modern methods of laboratory diagnosis of urogenital chlamydial infection. Kurskij nauchno-prakticheskij vestnik Che-lovek i ego zdorov' e. 2010; 2: 33–42 (In Russian).
2. Vorob'jov A.A., ed. Medical microbiology, Virology and Immunology. M.: ООО «Medicinskoe informacii onnoe agentstvo»; 2012 (in Russian).
3. Men'shikov V.V. Clinical laboratory guide. M.: Medicine, 1982 (in Russian).
4. Molochkov V.A. Urogenital chlamydiosis. M.: «Izdatel'stvo BINOM»; 2006 (in Russian).
5. Karaulov A.A., Afanaciev S.S., Aleshkin V.A., Lapin B.A., eds. Chlamydial infection. New aspects of the pathogenesis, immunology, verification and treatment of humans and primates infection. M.: Izdatel'stvo Per-vogo MG MU im. I.M. Sechenova. 2012 (in Russian).

Поступила 05.03.13



Полный перечень как традиционных, так и редких лабораторных тестов!

Новое издание классического Руководства предоставляет информацию как по традиционным лабораторным тестам, так и по редким и высоко-специализированным тестам и методикам, с изложением материалов по использованию и характеристике каждого теста. Дополнения внесены во все разделы, включая обзор по более чем 100 новым тестам!

В этом новом издании «Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests» :

- Обсуждаются важные темы, такие как биологическая вариабельность, референтные интервалы, диагностическая информация, клиническая интерпретация лабораторных данных, интерференции и виды образцов
- Имеются обширные материалы по четырем новым разделам:
 - Преаналитические аспекты клинического тестирования
 - Маркеры иммунофенотипирования
 - Фармакогеномика
 - Тестирование аллергии
- Включена расширенная информация по молекулярной диагностике и новым молекулярным технологиям, используемым в лабораториях
- Для быстрого доступа к ключевой информации предлагается Индекс тестов и Индекс заболеваний
- Представлен новый автор издания: Dr. Alan H.B. Wu – специалист в области клинической химии и токсикологии, привнесший в данную книгу свои знания и личный опыт

Перевод проф. В.В. Меншикова