

УДК 616.022.7-07:001.891.53

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ УРОГЕНИТАЛЬНОЙ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

© Зур Н.В., Миронов А.Ю.

Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии
Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова, Москва
E-mail: profmironov@mmascience.ru

Установлено, что для урогенитальной хламидийной инфекции характерно скрытое, хроническое течение, несоответствие клинических проявлений морфологическим изменениям в пораженных тканях, а также выраженные дисфункциональные изменения в системе антиинфекционной резистентности организма, вследствие чего происходит транслокация хламидий из мочевого тракта в экстраурогенитальные области организма с формированием вторичных очагов инфекции. Исходя из данных литературы, обосновывается необходимость дальнейшего совершенствования методов лабораторной диагностики урогенитальной хламидийной инфекции на основе расширения перечня исследуемых клинических образцов с целью создания единого алгоритма обследования больного с подозрением на генерализованную форму урогенитальной хламидийной инфекции.

Ключевые слова: урогенитальная хламидийная инфекция, генерализованная форма, лабораторная диагностика.

MODERN METHODS OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF UROGENITAL CHLAMYDIA INFECTIONS

Zur N.V., Mironov A.Yu.

Microbiology, Virology, Immunology Department of the I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Moscow

It was established that it's typical of urogenital chlamydia infection to have asymptomatic, chronic course, discrepancy between clinical presentations and morphological changes in invaded tissues, also, it has obvious dysfunctional changes in the system of anti-infectious resistance of organism, which is resulted in translocation of chlamydia from urogenital tract to extra-urogenital areas of organism with the formation of secondary nidus of infection. On the assumption of literature data there is a necessity of the following improvement of methods of laboratory diagnostics of urogenital chlamydia infection on the basis of enlargement of the list of researched clinical tests in order to establish the united algorithm of examination of a patient with suspect of generalized form of urogenital chlamydia infection.

Keywords: urogenital chlamydia infection, generalized form, laboratory diagnostics.

Урогенитальная хламидийная инфекция представляет серьёзную медико-социальную проблему для современного здравоохранения вследствие своего широкого распространения, частого развития осложнений и негативного влияния на репродуктивное здоровье населения [12]. По данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется более 330 млн. урогенитальных инфекций, среди которых число заражений хламидиозом достигает 100 млн. человек [28]. Статистическая регистрация заболеваемости урогенитальным хламидиозом в России, осуществляемая с 1993 года, свидетельствует о ежегодном увеличении числа больных, что позволило этой инфекции в настоящее время выйти на 2-е место среди всех инфекций, передаваемых половым путём (ИППП) [12]. По экстраполированным данным частота урогенитального хламидиоза в России ежегодно составляет более 1,5 млн. человек, при этом в большинстве случаев этиологический диагноз не устанавливается [7].

Мишенями для *Chlamydia trachomatis* служат клетки цилиндрического и переходного эпителия мочеполовых органов, прямой кишки, задней стенки глотки, конъюнктивы, синовиальной обо-

лочек суставов, а также эпителиальные и эпителиоидные клетки различных органов, клетки ретикулэндотелия, лейкоциты, моноциты, макрофаги [12, 13]. По данным многочисленных исследований, урогенитальным хламидиозом поражено 40-80% женщин и 20-60% мужчин с инфекционно-воспалительными заболеваниями мочеполовых органов [37]. В большинстве случаев урогенитальный хламидиоз протекает без выраженной клинической симптоматики, что существенно затрудняет диагностику, способствует распространению болезни и раннему развитию осложнений [28]. 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 (ВЗОМТ) и у 34% мужчин с эпидидимитом [21]. Основные клинические формы хламидийной инфекции у женщин — уретриты и цервициты, а наиболее распространённые осложнения (40%) — ВЗОМТ, протекающие бессимптомно у 40% больных [5]. Риск бесплодия составляет 25-75% после 1-3 эпизодов ВЗОМТ [28]. Существует взаимосвязь хламидийной инфекции со злокачественными образованиями, с развитием

дисплазии шейки матки. Предполагается, что возбудитель хламидиоза может являться кофактором бактериальной природы, способствующим прогрессированию неопластических процессов [1].

Наиболее часто встречающимися формами хламидийной инфекции у мужчин является уретрит и простатит, причём в 20-30% случаев они протекают без выраженных клинических симптомов. Из осложнений как правило, наблюдаются эпидидимиты и орхоэпидидимиты, возникающие у 1–3% больных с хламидийным уретритом с последующим развитием бесплодия [14]. Почти в 25% случаев идиопатическое бесплодие у мужчин с наличием бессимптомной инфекции *C. trachomatis* и отсутствием в анамнезе хламидийной инфекции коррелирует с наличием антиспермальных антител. Хламидии способны также потенцировать аутоиммунные процессы в организме, результатом которых может стать болезнь Рейтера и иммунологическое бесплодие [12].

Значение урогенитального хламидиоза в патологии человека определяется многоочаговостью поражения не только мочеполовых, но и других органов и систем организма 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 (САИР) организма, вследствие чего происходит транслокация хламидий из мочеполового тракта в экстраурогенитальные области организма с формированием вторичных очагов инфекции [15, 16, 31]. Широкое распространение урогенитальной хламидийной инфекции, разнообразие патологических проявлений, склонность к диссеминированию позволяет рассматривать её как одну из проблем, следующую по значимости за ВИЧ-инфекцией.

Возбудитель урогенитального хламидиоза — *Chlamydia trachomatis* (семейство Chlamydiaceae, род *Chlamydia*), обладает рядом особенностей, важных для диагностики этой инфекции [6]. Это облигатный внутриклеточный паразит, который не способен размножаться вне клеток организма хозяина, не растёт на питательных средах. Хламидии имеют уникальный цикл развития, протекающий в цитоплазме клеток организма с использованием ферментных систем клетки-хозяина. Они не способны самостоятельно синтезировать АТФ, являясь энергетическими паразитами, хотя получены данные, что хламидии могут синтезировать АТФ, хотя и в незначительных количествах, путём гликолиза и расщепления гликогена [3]. По своим таксономическим и морфологиче-

ским признакам хламидии близки к грамотрицательным бактериям, содержат ДНК и РНК; обладают цитоплазматической мембраной и клеточной стенкой. В отличие от других прокариот у них полностью отсутствует пептидогликановый слой и высококонсервативный ген *FtsZ*, ответственный за образование клеточной перегородки во время деления клетки; как грамотрицательные бактерии, чувствительны к антибиотикам широкого спектра действия.

Хламидии имеют уникальный внутриклеточный цикл развития, который включает три различные формы существования возбудителя [12, 18]. ЭТ (элементарное тельце) — экстрацеллюлярная, высокоинфекционная форма возбудителя, размером 250-300 нм, адаптированная к внеклеточному существованию, не способная к размножению, обеспечивающая диссеминацию инфекции в клетке или проникновение в другую чувствительную клетку. РТ (ретикулярное тельце) — интрацеллюлярная, неинфекционная форма репродукции размером до 1000 нм, которая обеспечивает продолжительность инфекции, «выживание» за счёт строгой внутриклеточной локализации. Аберрантные тельца — формы латентности, не поддающиеся культивированию, определяющие персистенцию инфекции благодаря нарушенной иммунной реакции, которую она порождает. Эти формы морфологически и антигенно отличаются от ЭТ и РТ. Они в 10-100 раз более крупные и характеризуются сниженным уровнем синтеза таких основных компонентов наружной мембраны, как главный белок наружной мембраны и ЛПС. В то же время 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 [5, 12, 28]. Проникновение хламидий в клетки происходит через трансмембранные каналы, которые содержат высокоаффинные сайты связывания и облегчения транспорта веществ, в том числе в течение эндоцитоза ЭТ. На поверхности клеток находится N-ацетил-нейраминавая кислота, которая взаимодействует с ЭТ менее вирулентных штаммов хламидий. ЭТ эффективнее взаимодействует с клетками, специфически обеднёнными данными рецепторами. При поглощении ЭТ в результате пиноцитоза наблюдается специфическое взаимодействие рецепторов плазматической мембраны с лигандами хламидий, что играет главную роль в процессе инфицирования монослоя *in vitro* слабо-вирулентными штаммами, так как высоковирулентные штаммы могут эффективно проникать посредством фагоцитоза. Фагоцитоз клеток ини-

цируется взаимодействием паразита и хозяина, которое включает поверхностный заряд и гидрофобность поверхности хламидийной клетки и клетки-хозяина [11].

При идентификации хламидий необходимо учитывать антигенные особенности патогена, родовую, видовую и типовую специфичность. Хламидии имеют сложную антигенную структуру. Выделяют три основных АГ: родоспецифический, видоспецифический и сероварспецифический (типоспецифический). В клеточной стенке хламидий содержится термостабильный ЛПС, являющийся родоспецифическим АГ. Эпитоп, определяющий родоспецифичность, расположен в углеводном участке и представлен трёхмономерным олигосахаридом (3-деокси-D-манно-октулозонавая кислота) [28]. Антигенные детерминанты видоспецифических и типоспецифических АГ термолabile, имеют белковую природу и локализованы в различных доменах интегрированных в неё белков наружной мембраны — Outer membrane proteins (Omp). Белковые компоненты наружной мембраны хламидий — обогащённые 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, формирующий мембранные поры, Omp 1 или MOMP, молекулярная масса которого составляет 40 кД. Остальная антигенная структура наружной мембраны представлена богатыми цистеином белками наружной мембраны второго типа с молекулярной массой 60 кД. В белках MOMP и Omp 2, содержащих видо- и типоспецифические эпитопы, имеются также области с высоким сходством среди видов (родоспецифические эпитопы). Это обуславливает возможность появления перекрестных реакций [5, 28].

Белок MOMP — доминантный АГ *C. trachomatis*, определяющий её серотип. Он содержит 4 переменных домена — VD1, VD2, VD3, VD4 (variable domain), в которых расположены главные нейтрализующие видо- и типоспецифические антигенные детерминанты, причём сероварспецифические участки локализованы преимущественно в VD2 и VD4. При рекомбинации этих участков изменится антигенная структура *C. trachomatis*, её рецепторный аппарат и бактерии станут невидимыми для АТ [5, 11]. Возбудителями урогенитального хламидиоза являются серотипы D-K *C. trachomatis*. Хламидии одного и того же урогенитального серовара могут содержать более одного типоспецифического эпитопа. MOMP *C. trachomatis* представлен в ЭТ и РТ, од-

нако его структура отлична. ЭТ содержат большое количество MOMP с перекрестными дисульфидными связями и цистеинбогатые белки, массой 60 кД, 125 кД и 15 кД, что определяет форму и осмотическую стабильность ЭТ. В нестабильных РТ MOMP не имеет перекрёстных связей и цистеинбогатые белки синтезируются и инкорпорируются в наружную мембрану хламидий на завершающих этапах цикла развития. MOMP является как порином, так и адгезином и экспрессируется во всех фазах развития хламидий. Периплазматический цистеиннасыщенный белок Omp 2 (OmcB) массой 60 кД присутствует исключительно в мембране ЭТ и участвует в процессе прикрепления и взаимодействия с клетками организма, что обуславливает вирулентность хламидий. Omp 3 (OmcA) белок 12 кД — гидрофильный липопротейн, сходный по структуре с муреиновыми липопотеидами грамотрицательных бактерий. В наружной мембране хламидий имеется 9 полиморфных белков (Pomp), которые участвуют во взаимодействии хламидий с защитными механизмами клетки-хозяина. Все эти протеины (Omp 3, Omp 3, Pomp) синтезируются в течение поздней фазы цикла развития и включаются в мембрану хламидий в процессе трансформации РТ в ЭТ [11]. Структурным белком клеточной стенки хламидий является термостабильный белок теплового шока (hsp) 60 из семейства 60 кД. Hsp, продуцируемый микробом. Он относится к числу главных АГ. Функции hsp — участие в развёртывании, свертывании и трансляции других белков, в сборке и разборке белковых комплексов в эндоплазматической сети и митохондриях. Такие белки, продуцируемые криптоической формой микроба и рассматриваемые как АГ, могут быть ошибочно приняты за признак аутоиммунного заболевания. Hsp активируют CD4 и CD8 Т-клетки. IgA к белкам теплового шока хламидий доминируют у женщин с первичным бесплодием и с повторяющимися спонтанными абортами. Наличие высоких титров противохламидийных IgG, в особенности АТ 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 АТ к *C. trachomatis* — hsp 60 связывают с развитием перигепатитов и спаечного процесса [11, 12].

Геном *C. trachomatis* состоит из 1000 пар нуклеотидов, содержит 9 генов Pomp и представлен двуспиральной ДНК-молекулой, на 44% состоящей из гуанина и цитозина, с молекулярной массой 660х106. В зараженных клетках присутствуют транскрипты этих генов Pomp, но неизвестно, происходит ли синтез всех 9 мембранных белков. Большое количество генов Pomp является источ-

ником антигенной изменчивости микроба. Почти все штаммы *C. trachomatis* содержат дополнительный генетический материал (криптическую плазмиду, имеющую в составе 7,5 тысячи пар нуклеотидов). Выявление последовательности нуклеиновых кислот используется в целях диагностики (ПЦР, ЛЦР). Мультикопийная криптическая плазида, являющаяся диагностической мишенью, отсутствует у 1-16% выделяемых культур хламидий, вызывающих урогенитальную инфекцию. В таких случаях ПЦР-тест-системы, направленные на выявление внехромосомной ДНК, дают ложноотрицательный результат. Для дифференциации и идентификации штаммов *C. trachomatis* используют вариабельные области в рибосомальных последовательностях ДНК, спейс-сортную область 16S-23S рРНК или ген *MOMP*, *Omp 2* [3, 11, 28].

На основании особенностей жизненного цикла хламидий, строения микроба, его взаимодействия с клетками организма, вызывающего мало- или асимптомное течение инфекции, часто характеризующейся персистентной или латентной формами заболевания со множеством клинических проявлений, можно сделать заключение, что в подавляющем большинстве случаев единственным достоверным критерием наличия урогенитального хламидиоза являются результаты лабораторных исследований. Успешная организация борьбы с урогенитальным хламидиозом возможна лишь при условии его своевременного и полного выявления. В этой связи решающее значение в постановке диагноза приобретают методы лабораторной диагностики [3]. Важность диагностики хламидийной инфекции отражена в приказах МЗ РФ № 281 от 07.12.1993 г. «О совершенствовании контроля за заболеваниями, передаваемыми половым путём (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 хламидиозов, определены показания к её 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 синдрома общей инфекционной интоксикации, персистирующей лимфаденопатии, катарального синдрома, оф-

тальмохламидиоза, синдрома поражения мочеполовых органов, сердечно-сосудистой, нервной систем и др.) и подтверждается результатами лабораторных исследований. Важным диагностическим критерием является обнаружение хламидий в крови [13, 14]. Это обусловлено высокой зависимостью результатов диагностики от выбора соответствующего метода лабораторного исследования; правильной подготовки пациента к исследованию; правильного взятия клиницистом материала для исследования из очагов хламидийного поражения; правильной предварительной подготовки забранного материала и своевременного проведения исследования; правильного хранения и доставки материала на исследование; материально-технического обеспечения лабораторного исследования; уровня квалификации медицинского персонала [10].

При урогенитальной хламидийной инфекции применяются две основные стратегии: обследование с целью диагностики, направленное на определение симптомов инфекции, вызванной *C. trachomatis* и обследование лиц, входящих в группу риска. Для микробиологической диагностики урогенитального хламидиоза применяют культуральный, микроскопический, серологический и молекулярно-генетические методы [3, 11].

«Золотым стандартом» в лабораторной диагностике урогенитального хламидиоза считается культуральный метод. Клиническим материалом, полученным от больного, заражают монослой культуры клеток McCoy, PL, HeLa-920, Herp-2, BGМК, культуру мышинных фибробластов L-929, обработанную антимагнетитами, цитостатиками [3, 6, 14]. Через 48-72 часа клетки фиксируют, обрабатывают красителями и микроскопируют. Результат оценивают по наличию специфических внутриклеточных хламидийных включений методами прямой или непрямой иммунофлюоресценции (с использованием моноклональных или поликлональных флюоресцирующих противохламидийных АТ). При получении отрицательных результатов рекомендуется произвести новый посев материала. Выявление хотя бы одного цитоплазматического включения, имеющего специфическое окрашивание, форму и структуру, достаточно для констатации наличия хламидий в исследуемом образце. Для повышения эффективности адсорбции и проникновения хламидий в клетки применяют различные поликатионы (DEAE-декстран-диэтиламиноэтилдекстран) для обработки монослоя перед заражением. Клетка хозяйина и наружная мембрана хламидий отрицательно заряжены, а поликатионы нейтрализуют анионную поверхность микроба, создавая условия для контакта. После заражения в питательную среду добавляют антимагнетиты (циклогексимид, L-

цистеин гидрохлорид, гидрокортизон, колхицин), которые ингибируют метаболические процессы в клетках хозяина и не влияют на хламидии, но косвенным путём стимулируют их репродукцию [11]. Самым широко распространённым методом культивирования в настоящее время является использование клеток McCoу, обработанных цитостатиком циклогексимидом [28]. Для подавления сопутствующей микрофлоры в клинических образцах в питательную среду добавляют антибиотики и антимикотики в таких дозах, которые не ингибируют размножения хламидий и не обладают токсичностью для клеток хозяина. Вирулентность и инфекционность хламидий увеличивается при центрифугировании клеточного монослоя с инокулированным материалом. Метод выделения хламидий в культуре клеток позволяет проводить определение чувствительности хламидий к антибиотикам на изолированных штаммах и обнаруживать штаммы, не содержащие плазмиду [3, 6, 28]. Чёткие критерии определения штамма, чувствительного или устойчивого к данному антибиотику, отсутствуют, поскольку системы *in vitro* не учитывают роли иммунных факторов хозяина в элиминации патогена [22]. Культуральный метод — самый трудоёмкий и дорогостоящий, продолжительный по длительности исследования (3-14 суток), требующий соблюдения строгих правил транспортировки клинического образца и температурного режима, наличия высококвалифицированного медицинского персонала. По специфичности (100%) данный метод является эталонным, однако его чувствительность может варьировать от 33 до 85% [7, 10, 35]. Для выявления генитального хламидиоза рекомендуется использовать культуры как из уретры, так и из цервикального канала, что позволяет увеличить (на 5%) выделение микроба [28]. При неактивном хламидиозе, когда в неразвивающихся РТ 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 *S. trachomatis*, а также при взятии у пациента с хламидиозом материала с низким количеством жизнеспособных патогенов удельный вес выявления хламидий невелик [11].

Микроскопический метод диагностики урогенитального хламидиоза наиболее прост и доступен. Он даёт общее представление о цитологической картине, морфологии клеток из очага поражения, наличии микробного обсеменения, грибов и простейших. Специфические морфологические признаки позволяют определить наличие хламидий в препарате. Наиболее распространёнными методами являются окраска препаратов по Рома-

новскому-Гимзе, Маю-Грюнвальду-Гимзе, по Маккиавелло, по Папаниколау, раствором Люголя [6, 10, 28]. При окраске по Гимзе включения хламидий выявляются как округлые или овоидные структуры, состоящие из красно-фиолетовых ЭТ и сине-фиолетовых РТ. В препаратах можно оценить морфофункциональное состояние лимфоцитов и нейтрофилов. Наличие в препарате телец Гальбершtedтера-Провачека подтверждает диагноз хламидиоза, однако их отсутствие не исключает наличия инфекции. На частоту обнаружения включений существенное влияние оказывает характер течения инфекционного процесса, качество исследуемых соскобных препаратов. Чувствительность метода составляет 10-15%, специфичность 10-30% [5]. Метод неприменим для скрининговых исследований. Диагностическая значимость микроскопического метода достаточно низкая: у мужчин обнаружить хламидии с его помощью удаётся лишь в 10-15%, а у женщин — до 30-40% случаев (в соскобах из цервикального канала) [10]. При правильном взятии материала от больных (со слизистых влагалища и щеки) и при соответствующей высокой квалификации врача диагностическая значимость световой микроскопии для обнаружения хламидий не уступает прямой РИФ и превосходит ИФА.

Серологические методы позволяют обнаруживать в биологическом материале (моча, мокрота, соскоб из уретры, цервикального канала, ротоглотки, эякулят, сок предстательной железы, слюва, лейкоконцентрат, мазки периферической крови, суставная жидкость) наличие родо- или видоспецифического АГ — РИФ, либо специфических АТ классов IgA, IgM, IgG — ИФА.

РИФ основана на обнаружении АГ хламидий в эпителии и других тканях специфическими моноклональными или поликлональными АТ к разным АГ хламидий — ЛПС, МОМР, а также к рекомбинантным АГ. От качества используемых люминесцирующих АТ зависит чувствительность метода [5]. При производстве АТ для «РекомбиСлайдХламидия» российского предприятия НПФ ЛАБдиагностика используется первый в России генноинженерный рекомбинантный белок хламидий, состоящий из видоспецифических эпитопов (к МОМР) поверхностного АГ *S. trachomatis*. При использовании моноклональных АТ преимущественно окрашиваются ЭТ хламидий и в меньшей степени РТ. Применение поликлональных хламидийных АТ позволяет выявлять все формы (элементарные, цитоплазматические включения, персистирующие, переходные, ретикулярные) хламидий. Сейчас помимо лучших импортных наборов («Chlamyset», Финляндия, «Syva Micro Trak», США) появились и широко

применяются отечественные моноклональные АТ («ХлаМоноСкрин», «ХлаМоноСкрин-2»). Набор поликлональных АТ «РекомбиСлайдХламидия» позволяет обнаруживать все формы *S. trachomatis* на разных стадиях их развития.

Существует два варианта РИФ — прямой (ПИФ) и непрямой (РНИФ). В первом случае специфическое АТ мечено флюорохромом, и реакция проходит в один этап. Во втором случае специфическое АТ не имеет метки, и для выявления образовавшегося на комплекса АГ-АТ используют меченые антиглобулиновые АТ. Результат РИФ оценивают визуально под люминесцентным микроскопом. Он положительный, если препарат содержит клетки эпителия и удаётся обнаружить не менее 5-10 ярко-зеленых флюоресцирующих ЭТ [5, 11, 18].

ПИФ и РНИФ широко применяются для диагностики урогенитального хламидиоза, однако их дальнейшее применение сдерживается тем, что их специфичность и чувствительность находятся в пределах 85-99% и 50-90% соответственно [5, 10, 19, 24, 35]. Это связано с тем, что специфические АТ выпускаются разными фирмами и различаются по своему качеству. Помимо жёстких условий к качеству самих тест-систем, важное значение для получения достоверных результатов имеют подготовка пациентов к исследованию, качество взятия материала для исследования, дальнейшая его обработка и хранение. Необходимо наличие высококвалифицированных специалистов по люминесцентной микроскопии. Только при корректном исполнении опытным лаборантом ПИФ может быть очень чувствительной и высокоспецифичной [20, 24, 30]. ПИФ целесообразно использовать для диагностики в группах высокого риска по урогенитальному хламидиозу, особенно у пациентов с клиническими проявлениями ИППП, и не оправдана для выявления АГ *S. trachomatis* в группах низкого риска, в том числе подлежащих скрининговому обследованию [20, 32]. При сравнительном исследовании ПЦР-диагностикума («Amplicor», Roche) и ПИФ для выявления *S. trachomatis* в уретральных и цервикальных образцах, в основном с низким содержанием ЭТ, установлено, что чувствительность ПИФ в 10 раз выше, чем ПЦР. Диагностическая информативность ПИФ связана с её способностью выявлять не только корпускулярные, но и растворимые АГ хламидий. При этом 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 [11].

ИФА широко применяется для диагностики в инфекционной патологии. На рынке диагностиче-

ских тест-систем предлагается большое количество наборов зарубежных и отечественных производителей. ИФА основан на выявлении родоспецифического ЛПС хламидий. Он удобен для скрининговых исследований, поскольку возможна приборная и объективная регистрация результатов анализа. Чувствительность и специфичность метода составляет 20-98% и 80-99% соответственно. При хронической инфекции, особенно при персистенции хламидий, вероятность детекции патогена невелика, что часто приводит к ложноотрицательным результатам [11, 26, 35]. В ИФА преимущественно определяют наличие и титр противохламидийных АТ — IgM, IgA, IgG в сыворотке крови, что перспективно при определении стадии и характера течения болезни [18, 26]. Если препарат для ИФА конъюгирован с пероксидазой, можно получить большое количество ложноположительных результатов, поскольку многие микробы и клетки организма обладают собственными пероксидазными системами, поэтому метод повсеместно отвергнут при выявлении АГ, но остается ведущим для серодиагностики [14]. Наиболее часто ложноположительный результат ИФА встречается при определении специфических АТ класса IgM и может быть обусловлен наличием ревматоидного фактора, физиологической гиперпродукцией IgM при беременности, перекрестной реакцией с АГ других возбудителей, аутоиммунным процессом, нарушением обмена веществ [27].

Хламидии обладают низкой иммуногенностью, вследствие чего выработка и накопление АТ в организме происходят в малых количествах. Лучше всего брать кровь для исследования в период обострения заболевания. Это позволяет обнаруживать антихламидийные АТ, лишь у 55-65% больных при наличии в 2-5% случаев ложноположительных результатов [14]. Титр АТ зависит от иммунореактивности организма и скорости их элиминации из него. Поэтому постановка диагноза хламидиоза по единичному анализу возможна лишь при наличии высокого титра противохламидийных АТ преимущественно IgM. IgM в сыворотке крови являются ранним маркером инфекции и определяются уже через 5 дней после начала заболевания и полностью исчезают через 2-3 месяца независимо от проведённого лечения. IgA вырабатываются в сывороточной и секреторной формах. Секреторный IgA индуцируются в местах проникновения патогена — сначала выявляются в эякуляте и вагинальном отделяемом, в сыворотке крови появляются через 10-14 дней после начала заболевания, обычно параллельно появлению IgG, только на более низком уровне и свидетельствуют о прогрессировании заболевания. Уровень IgA обычно снижается ко 2-4-му месяцу

в результате успешного лечения, при реинфекции их уровень вновь возрастает. IgA являются маркёром как острой формы, так и манифестации при хронической форме инфекции. В течение короткого периода параллельно могут присутствовать IgM и IgA. Определение IgA более информативно в качестве маркёра активной стадии хламидийной инфекции или при мониторинге эффективности лечения, так как эти АТ имеют небольшой период полураспада. В этот же период или чуть позже могут быть выявлены IgG. После перенесенной инфекции IgG могут определяться на низком уровне в течение многих лет. При реинфекции или реактивации наблюдается заметное увеличение уровня IgG, который у нелеченых пациентов сохраняется неизменным. Высокий уровень антихламидийных IgG диагностически важен при хронических или системных инфекциях [11]. Наиболее корректно определять сероконверсию антихламидийных АТ (IgA и IgG) при исследовании парных сывороток. Выявление 2-3-кратного снижения титра АТ указывает на адекватность и эффективность проводимых лечебных мероприятий, 4-кратная сероконверсия свидетельствует об обострении или прогрессировании заболевания. Для верификации персистирующей хламидийной инфекции целесообразна постановка ИФА не только на наличие АТ классов IgA, IgM, IgG, но и для определения IgG к hsp 60 хламидий [3, 16, 25]. ИФА имеет большое значение при эпидемиологических обследованиях среди пациентов групп риска, особенно в развивающихся странах [28, 32].

Серодиагностика хламидийной инфекции до настоящего времени недостаточно успешна, поскольку заболевание вызывается низкоиммунным патогеном. АТ к хламидиям сохраняются длительное время, поэтому даже у здорового населения может отмечаться фоновый титр АТ к хламидиям. При продолжительной и осложненной хламидийной инфекции можно использовать методы серодиагностики. РНИФ — довольно точный метод исследования, но для его проведения требуется высокая профессиональная подготовка. Эта реакция является основой как для дифференциации *C. trachomatis*, так и для диагностики заболеваний у определенных категорий больных, к которым относятся дети с перинатальными пневмониями и больные с тяжёлыми формами генерализованных хламидийных инфекций. Выявление АТ к хламидиям только в одной пробе сыворотки даже при титре 1:8-1:16 может свидетельствовать как о вероятности текущей хламидийной инфекции, так и о наличии следовой реакции, связанной с любым перенесённым в прошлом заболевании хламидийной этиологии. Нарастание титра хламидийных АТ до 1:64-1:256

и выше даже в одной пробе сыворотки при длительно текущих и осложненных формах инфекции отражает предельное нарастание гуморальной реакции организма и при соответствующих результатах клинико-эпидемиологического анализа и учёте анамнестических данных приобретает диагностическое значение. РНИФ позволяет также проводить идентификацию хламидий до вида при наличии соответствующих тест-объектов и титровании сывороток по отношению к конкретным видам возбудителей. Высокую специфичность и информативность (90%) имеет РНИФ для определения уровня специфических иммуноглобулинов различных классов в сыворотке крови [6, 14].

Молекулярно-генетические методы диагностики в последние годы заняли место «золотого стандарта», которое ранее принадлежало культуральному методу [5, 12]. Разработаны методы гибридизационного анализа на основе меченых ДНК/РНК-зондов. В качестве гибридизационных зондов использовали фрагменты ДНК, полученные путём 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 патогена. Чувствительность метода составляет 70-85%; его преимуществом является возможность тестирования большого количества образцов, быстрота, автоматизация, может применяться только для образцов материала, полученных инвазивными методами (из шейки матки, уретры) [4].

Методы ДНК-диагностики основаны на комплементарном взаимодействии нуклеиновых кислот, которое позволяет с высокой точностью идентифицировать последовательность нуклеотидов в генах искомого микроба. Среди них наибольшее распространение получила ПЦР. В основе ПЦР лежит многократная амплификация определенного фрагмента ДНК, который является маркёрным для данного патогена. 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 методом ИФА. К преимуществам этого метода относятся высокая чувствительность 70-95% и специфичность 97-99%, а также возможность тестирования большого числа образцов [15, 20, 29, 35]. При помощи ПЦР возможно получение прак-

тически неограниченных количеств специфической ДНК. ПЦР применяют для выявления ДНК хламидий и типирования штаммов. Низкое качество реагентов для ПЦР является причиной невозпроизводимости результатов, обусловленной инактивацией наиболее лабильных реагентов тест-систем (праймеры, ДНК-полимераза); неадекватно выбранной генетической мишенью. Самыми чувствительными диагностическими ПЦР-системами являются системы детекции криптической плазмиды, поскольку каждая клетка *C. trachomatis* содержит 10-20 копий плазмидной ДНК. У некоторых клинических изолятов количество бесплазмидных штаммов *C. 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 генов, не гомологичные родственным генам других видов. Идеальной мишенью оказался ген *Kdo*-трансферазы (*gseA*), кодирующий фермент, принимающий участие в синтезе одного из основных родоспецифических компонентов ЛПС. Эта тест-система обладает высокой специфичностью при относительно низкой чувствительности, что не позволило использовать её для диагностики хламидиоза [3]. 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 существенно низкой (53-73%). При проведении скрининговых эпидемиологических исследований этот материал также может быть использован [17].

Качество ПЦР-диагностики принципиально зависит от специфичности используемых праймеров, строгого соблюдения технологического режима, квалификации исследователя. Возможно получение ложноположительных результатов вследствие некачественно подобранных праймеров и ложноотрицательных результатов из-за ингибирования реакции. ПЦР не требуют 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 [28, 35]. Следует учитывать высокую стоимость исследования, обусловленную дороговизной качественных праймеров для ПЦР-диагностики, и высокую стоимость лабораторного оборудования, что ограничивает применение этого метода в широкой лабо-

раторной практике. Помимо ПЦР на основании методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) созданы разнообразные альтернативные технологии — LCR (ligase chain reaction), NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), TMA (Transcription-Mediated Amplification), SDA (Strand Displacement Amplification), и другие, с помощью которых выявляют *C. trachomatis*.

В основе ЛЦР лежит легирование олигонуклеотидов, комплементарных определённой 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. Она может быть использована для анализа уретральных, эндоцервикальных образцов и проб мочи, при этом отмечается повышенная чувствительность определения *C. trachomatis* в моче у женщин [32].

Метод амплификации с применением QB-репликазы, копирующей РНК-матрицу (Gene Trak), основан на внедрении одноцепочечного олигонуклеотидного зонда в молекулу РНК, которая может быть амплифицирована экспоненциально после гибридизации мишени ферментом QB-репликазой [34]. 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 [36]. TMA (Gen-Probe) — транскрипционная амплификация — метод, основанный на применении амплификации с помощью транскрипции и гибридизации для качественного определения рибосомальной РНК *C. trachomatis* в исследуемых пробах (мишенями являются гены 16S рРНК). Использование двух праймеров и двух ферментов даёт возможность транскрипции ДНК и последующих РНК ампликонов в изотермальных условиях [11]. На основе изотермической реакции аналогично TMA 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 *C. trachomatis* и *N. gonorrhoeae*. В настоящее время для диагностики урогенитального хламидиоза рекомендуется использовать МАНК: Cobas Amplicor, Roche (ПЦР), ЛЦР, Abbott и метод ПЦР в реальном времени [28].

Методы экспресс-диагностики хламидиоза — иммунохроматографические и ферментспецифические. Иммунохроматографические методы основаны на образовании комплекса АГ-АТ-цветной латекс, который формирует окрашенную

зону на нитроцеллюзном фильтре. В основе метода Chlamydia STA-PAK лежит комбинация конъюгата моноклональных АТ и коллоидного золота с поликлональными АТ, иммобилизованными на твёрдой 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; отмечается простота и незначительное время исследования [3, 11].

Для верификации урогенитальной хламидийной инфекции предложен новый способ диагностики — реакция специфического лейкоцитолита (РСЛ), основанная на определении в крови высокого показателя разрушения лейкоцитов у больных урогенитальным хламидиозом. РЛС обладает высокой чувствительностью (100%) и может быть использована в качестве подтверждающего теста в комплексной диагностике урогенитальных заболеваний [9].

Важным звеном в комплексе клинко-лабораторных мероприятий при урогенитальном хламидиозе является оценка эффективности проводимой терапии — применение лабораторных тестов для установления критерия излеченности. Главным надежным методом установления эффективности проведённого лечения является культуральный метод (через 14 дней после окончания антибактериальной терапии), использование ПЦР не рекомендуется для целей контроля лечения. Адекватными и доступными способами контроля излеченности хламидийной инфекции являются ПИФ и ПЦР, выполненные соответственно не ранее чем через 2 недели и через 30-40 дней после окончания терапии. Сочетание различных диагностических методик существенно повышает эффективность и надежность контроля терапии урогенитального хламидиоза [2, 12].

Путём многолетних научно-прикладных исследований создана основа лабораторных методов диагностики урогенитального хламидиоза, позволяющая в большинстве случаев достоверно устанавливать наличие инфекции, динамику воспалительного процесса, эффективность проводимой терапии и критерия излеченности [3]. Выбор метода исследования и способ оценки результатов при диагностике урогенитального хламидиоза имеют важное значение. Вместе с тем ни один из существующих методов диагностики урогенитальной хламидийной инфекции не является оптимальным. «Золотым стандартом» является гра-

мотный комплексный подход к диагностике хламидиоза — подтверждение наличия патогена двумя или тремя различными методами [3, 12, 23]. 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 [17].

В настоящее время отсутствует не только единый алгоритм обследования больного с подозрением на урогенитальную хламидийную инфекцию, особенно на распространённую форму урогенитальной хламидийной инфекции с затяжным, рецидивирующим течением заболевания, но и единое мнение о трактовке полученных результатов. Для достоверной верификации возбудителя при генерализованной хламидийной инфекции необходимо расширять перечень исследуемых клинических образцов от больных не только из урогенитального тракта, но также из других органов и систем. Важным лабораторно-диагностическим критерием при этом является обнаружение хламидий в крови, что позволяет объективно диагностировать генерализованную форму урогенитальной хламидийной инфекции [8, 13, 14]. Разработка современных, недорогих, высокочувствительных и специфичных методов лабораторной диагностики урогенитального хламидиоза остается актуальной и представляет огромное значение для медицинской науки и практического здравоохранения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Афанасьев М.С., Алешкин В.А., Афанасьев С.С. и др. Вирусно-бактериальная природа дисплазии и рака шейки матки // Вестник РАМН. — 2004. — № 6. — С. 35–40.
2. Башмакова М.А., Савичева А.М. Лабораторная диагностика генитальных инфекций // Проблемы репродукции. — 2000. — Т. 6, № 1. — С. 20–24.
3. Дмитриев Г.А. Лабораторная диагностика бактериальных урогенитальных инфекций // М.: Медицинская книга, Н. Новгород: Изд-во НГМА. — 2003. — 336 с.
4. Европейские стандарты диагностики и лечения заболеваний, передаваемых половым путём. — М.: Мед. лит., 2006. — 272 с.
5. Инфекции, передаваемые половым путём / Под ред. В. А. Аковбяна, В. И. Прохоренкова, Е. В. Соколовского. — М.: Издательство «Медиа Сфера», 2007. — 744 с.
6. Колкова Н.И., Мартынова В.Р. К вопросам диагностики хламидийных инфекций // Клинич. лабораторная диагностика. — 1998. — № 2. — С. 20–21.
7. Кудрявцева Л.В., Мисюрина О.Ю., Генерозов Э.В. и др. Клиника, диагностика и лечение хламидий-

- ной инфекции: Пособие для врачей. – М., 2001. – 40 с.
8. Лобзин Ю.В., Ляшенко Ю.И., Позняк А.Л. Хламидийные инфекции. – СПб: ООО «Издательство ФОЛИАНТ». – 2003. – 400 с.
9. Мананков В.В., Пашианина Т.П., Смелянский В.П. Диагностическое значение реакции лейкоцитолита у больных хламидиозом // Информационный сборник. – Сер. Медицина. – Вып. 4. – Аллергия, астма и клиническая иммунология. – М., 1997. – С. 76.
10. Медицинская лабораторная диагностика: Справочник // Под ред. проф. А.И. Карпищенко. – СПб: Интермедика, 1997. – 304 с.
11. Метельская В.А., Алешкин В.А., Зверев В.В. и др. Современные методы лабораторной диагностики хламидиозов // ЖМЭИ – 2008. – № 4. – С. 111–117.
12. Молочков В.А. Урогенитальный хламидиоз. – М.: «Издательство БИНОМ», 2006. – 208 с.
13. Позняк А.Л., Лобзин Ю.В., Добрынин В.М., Бабкин П.А. Сравнительная эффективность рациональных схем этиотропной терапии генерализованных форм хламидийной инфекции у лиц молодого возраста // Урология. – 2000. – № 5. – С. 23–26.
14. Позняк А.Л., Шестаев А.Ю., Нуралова Н.В. и др. Особенности лабораторной диагностики хламидиозов с системными проявлениями // Клиническая лабораторная диагностика. – № 6. – 2002. – С. 42–45.
15. Пухнер А.Ф., Козлова В.И. Хламидийные экстрагенитальные заболевания. – М.: Изд-во «Триада-Х», 2004. – 128 с.
16. Савенкова М.С. Хламидийная и микоплазменная инфекции в практике педиатра // Consilium Medicum. – 2005. – Т. 7, № 1. – С. 10–17.
17. Савичева А.М. Этиологическая диагностика и терапия репродуктивно значимых инфекций // Трудный пациент. – 2007. – Т. 5, № 1. – С. 22–28.
18. Савичева А.М., Соколовский Е.В., Домейка М. Краткое руководство по микроскопической диагностике инфекций, передаваемых половым путём. – СПб.: ООО «Изд-во Фолиант», 2004. – 128 с.
19. Тейлор-Робинсон Д. Диагностика хламидиоза: решают ли современные достижения проблемы клинической практики? // ЗППП. – 1996. – № 6. – С. 13–14.
20. Тейлор-Робинсон Д., Рентон А. Какие тесты для диагностики инфекций, передаваемых половым путём, следует использовать в индустриально развитых странах // ЗППП. – 1998. – № 5. – С. 23–26.
21. Чеботарев В.В. Урогенитальный хламидиоз: современные проблемы диагностики, патогенеза, лечения // Венеролог. – 2004. – № 1. – С. 43–48.
22. Шитицына Е.В., Савичева А.М., Хуснутдинова Т.А. и др. Устойчивость Chlamydia trachomatis к антибиотикам in vitro: методологические аспекты и клиническое значение // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. – Т. 6, № 1. – С. 54–64.
23. de Berbeyrac B., Bebear C. Histoire naturelle des infections a Chlamydia. Physiopathologie des infections a Chlamydia: consequences diagnostiques et therapeutiques // Arch. Pediatr. – 2005. – Vol. 12, N 1. – P. 26–31.
24. Herrmann B., Espinosa F., Villegas R.R. Genital chlamydial infection among women in Nicaragua: validity of direct fluorescent antibody testing, prevalence, risk factors and clinical manifestations // Genitourin. Med. – 1996. – Vol. 72, N 1. – P. 20–26.
25. Horner P.J. Antigen capture ELISA for the heat shock protein (hsp 60) of Chlamydia trachomatis // J. Clin. Pathol. – 1996. – Vol. 49, N 8. – P. 642–647.
26. Koivisto A.L., Isoaho R., Von Hertzen L. et al. Chlamydial antibodies in an elderly Finnish population // Scand. J. Infect. Dis. – 1999. – Vol. 31, N 2. – P. 135–139.
27. Lobau S. Molecular cloning, sequence analysis, and functional characterization of the lipopolysaccharide biosynthetic gene kdtA encoding 3-deoxy-alpha-D-mannooctulononic acid transferase of Chlamydia pneumoniae strain TW-183 // Mol. Microbiol. – 1995. – Vol. 18. – P. 391–399.
28. Microbiology & Microbial infections. Topley & Wilsons. – N. Y.: Edward Arnold (Publishers) Ltd., 2005. – Bacteriology. – Vol. 2, Part. VI. – Chapter 78. – P. 2006–2022.
29. Naher H., Hochstetter R., Petzoldt D. Evaluierung der Polymerasekettenreaction zum Nachweis von C. trachomatis aus urogenitalem Abstrichmaterial // Hautarzt. – 1995. – N 10. – P. 633–636.
30. Ostergaard L., Moller J.K. Use of PCR and direct immunofluorescence microscopy for confirmation of results obtained by Syva Micro Trak Chlamydia enzyme immunoassay // J. Clin. Microbiol. – 1995. – Vol. 33, N 10. – P. 2620–2623.
31. Ponsioen C.Y., Defoer J., Ten Kate F.J. et al. A survey of infections agents as risk factors for primary sclerosing cholangitis: are Chlamydia species involved? // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. – 2002. – Vol. 14, N 6. – P. 641–648.
32. Schachter J. DFA, EIA, PCR, LCR and other technologies: what tests should be used for diagnosis of chlamydia infections? // Immunol. Invest. – 1997. – Vol. 26, N 1–2. – P. 157–161.
33. Sciarra J.J. Sexually transmitted diseases: global importance // Int. J. Gynecol. Obstet. – 1997. – Vol. 58, N 1. – P. 107–119.
34. Shah J.S., Liu J., Smith J. et al. Novel, ultrasensitive, Q-beta replicase amplified hybridization assay for detection of Chlamydia trachomatis // J. Clin. Microbiol. – 1994. – Vol. 32, N 11. – P. 2718–2724.
35. Stary A. European Guideline for management of Chlamydia infection // Int. J. STD&AIDS. – 2001. – Vol. 12, N 3. – P. 31–33.
36. Van Gemen B., Van Beuningen R., Nabbe A. et al. A one-tube quantitative HIV I RNA NASBA nucleic acid amplification assay using electrochemiluminescent (ECL) labeled probes // J. Virol. Methods. – 1994. – Vol. 49. – P. 157–167.
37. Xu F., Schillinger J.A., Markowitz L.E. et al. Chlamydia trachomatis infection in women: analysis through a surveillance case registry in Washington State, 1993–1998 // Am. J. Epidemiol. – 2000. –