|  |  |
| --- | --- |
|

|  |
| --- |
| ХЛАМИДИОЗ - СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ*Цитоскопические методы обнаружения хламидий*При цитоскопическом методе одновременно с поиском цитоплазматических клеток-включений Провачека учитывается количество лейкоцитов как показателя воспаления, а также дополнительная информация о наличии сопутствующей бактериальной микрофлоры, дрожжеподобных грибов, трихомонад и т.п.Показания: Острая фаза заболевания.Материалом для исследования служат соскобы из уретры у мужчин и уретры и /или цервикального канала у женщин. Материал берут специальными щеточками или ложечками Фолькмана. Выделения из цервикального канала удаляются ватным тампоном. Щеточка вводится в канал на 1-2 см, вращается 15 секунд . Соскобный материал распределяется на предметном стекле, высушивается на воздухе и фиксируется в метаноле или холодном ацетоне. Наиболее популярна окраска по Романовскому-Гимзе. После окраски препараты просматриваются в световом микроскопе, используя иммерсионный объектив (х90). При этом цитоплазма клеток окрашивается в голубой цвет, ядра в фиолетово-синий, цитоплазматические включения определяются в виде темно-синих или розовых микроколоний на фоне голубой цитоплазмы. На стадии элементарных включения хламидий окрашиваются в розовый цвет, на стадии элементарных телец -в синий.Цитоскопический метод широко доступен, но эффективен лишь при острых формах инфекции, значительно менее эффективен и информативен при хронических формах заболевания При урогенитальном хламидиозе частота обнаружения телец Провачека в соскобах уретры и цервикального канала не превышает 10-12 %. Наличие этих телец подтверждает диагноз хламидиоза, однако их отсутствие не исключает наличие инфекции. |

 |
|

|  |
| --- |
| *Прямая иммунофлюоресценция (ПИФ)*Этот метод предусматривает прямое выявление антигенов хламидий. При люминесцентной микроскопии включения хламидий определяются в виде зеленой или желто-зеленой флюоресценции включений на коричнево-оранжевом фоне цитоплазмы клеток Включения могут иметь зернистую гомогенную или смешанную структуру.Показаниями для диагностики хламидийной инфекции этим методом являются:1.Острая фаза заболевания.2.Хроническая фаза заболевания3 Установление этиологии хронического инфекционного процесса урогенитального тракта4. Беременность с отягощенным акушерским анамнезом5. Бесплодие неясного генеза.Диагностическая информативность ПИФ связана с тем, что с ее помощью выявляются не только корпускулярные, но и растворимые антигены хламидий Этот метод не зависит от возможного изменения тинкториальных свойств микроорганизма в процессе заболевания и лечения. ПИФ-метод является важнейшим скриннинговым методом диагностики урогенитального хламидиоза. Его чувствительность и специфичность при использовании моноклональных антител составляет соответственно 65-90% и 85-90%. При оценке результатов следует учитывать, что только показатели внутриклеточной флюоресценции могут оцениваться в качестве положительного результата этого теста при использовании поликлональных антихламидийных антител, при использовании моноклональных - результат считают при наличии 10 ЭТ в поле зрения. Соскобные препараты готовят также, как и для цитоскопических исследований.Выпускают диагностические наборы, содержащие моноклональные антитела для ПИФ, следующие фирмы: Syva, Drfco, Kallastad, Bartrels, Boots celltech, California Integrated Diagnostics, Orion Diagnostica. Реагенты фирм Syva, Difco, Kallastad представляют собой меченные ФИТЦ моноклональные антитела к основному белку наружной мембраны хламидий, а реагенты других фирм - моноклональные антитела к родоспецифическому хламидийному липолисахариду (ЛПС). В России ЗАО “НИАРМЕДИК плюс” при НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН выпускает моноклональные антитела к ЛПС хламидий, которые успешно конкурируют с продукцией иностранных фирм по качеству продукции. Это набор “Хламоноскрин” для определения моноклональных антител к родоспецифическому липополисахаридному антигену и набор “Хламоноскрин-2” для определения моноклональных антител к видоспецифическому белковому антигену хламидий трахоматис. Наборы имеют ФС 42-359598 и регистрационное удостоверение Минздрава России 93/ 270/ 9 .Моноклональные антитела отличаются друг от друга по вызываемой яркости свечения, постоянству выявляемых форм ЭТ и степени специфичности. Для диагностики хламидий этим методом необходим люминесцентный микроскоп.В целом, метод ПИФ отвечает критериям высокой чувствительности и специфичности, но требует исполнения опытным, компетентным лабораторным работником.Высококвалифицированная экспертная оценка методом ПИФ редко бывает доступной, поэтому средняя чувствительность его снижается. Метод недостаточно чувствителен и для стабильного определения малых количеств ЭТ. К тому же невозможно проверить и отрицательные результаты, и, следовательно, обнаружить среди них ложноотрицательные, что приводит к снижению чувствительности. |

 |
|

|  |
| --- |
| *Иммуноморфологические методы*Эти методы основаны на обнаружении антигенных субстанций хламидий в эпителии и других тканях путем обработки препаратов специфическими антителами. Антитела диагностической антихламидийной сыворотки соединены с какой-либо меткой - люминесцирующей (ФИТЦ-антитела) или ферментной (энзим-меченые антитела).  |

 |
|

|  |
| --- |
| *Непрямой метод иммунофлюресценциии*Непрямой метод иммунофлюресценции применяют в тех случаях, когда нет в наличии ФИТЦ-конъюгата антихламидийных антител. В этих случаях приготовленный тем же методом, что и для ПИФ препарат из клинических проб обрабатывают вначале антихламидийными антителами, полученными путем иммунизации хламидиями овец, кроликов, мышей или других животных, а затем второй сывороткой, специфичной для вида животного, которое было иммунизировано хламидиями. Антитела второй сыворотки конъюгированы с ФИТЦ. Показания к применению и специфичность данного метода совпадают с ПИФ. |

 |
|

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| *Методы иммуноферментного анализа*Эти методы основаны на обнаружении растворимого антигена хламидий в исследуемых пробах. Чаще используются наборы реактивов Imx Select Хламидия (Abbott Laboratories) и Chlamydia-antigen Elisa (Medac Diagnostica).Тест Imx Select Хламидия основан на технологии ИФА-анализа на микрочастицах (МИФА) и предназначен для качественного определения липолисахаридного антигена С. trachomatis в эндоцервикальных и уретральных мазках на анализаторе Imx. Данный набор содержит компоненты, полученные из человеческого материала, что обуславливает соблюдение при работе правил биологической безопасности.Узел пробоотборник/электрод добавляет микрочастицы в лунку, содержащую образец. Предварительно экстрагированный липолисахаридный антиген (ЛПС) образца связывается с микрочастицами. Аликвота реакционной смеси, содержащей комплексы микрочастиц с ЛПС-антигеном, переносится на стекловолокнистый матрикс реакционной ячейки. Микрочастицы необратимо связываются с матриксом. К матриксу добавляются кроличьи антитела против хламидий. Они связываются с ЛПС антигеном. Биотинилированные козьи анти-кроличьи антитела добавляются к матриксу и связываются с комплексом анти-хламидия/ЛПС антиген. К матриксу добавляется конъюгат щелочной фосфатазы и антител против биотина. Происходит связывание конъюгата с комплексом антиген/антитело. После удаления не связавшегося материала промыванием к матриксу добавляется субстрат 4-метилумбеллиферилфосфат. Образование флуоресцирующего продукта измеряется в оптическом узле МИФА.Тест-система Chlamydia-Antigen-ELISA medac (регистрационное удостоверение Минздрава РФ 97/128 от 07.02.97 г.) является экономным и в то же время достаточно специфичным и чувствительным методом в рутинной диагностике хламидийной инфекции. Этот тест представляет собой метод твердофазного ИФА-анализа для определения антигенов хламидий. Твердая фаза покрыта хламидийными моноклональными антителами установленной специфичности. Амплификация достигается с использованием технологии полимерной конъюгации, в результате чего происходит фиксация, при которой на каждый связанный участок антигена приходится полимерный комплекс с высокомолекулярным фрагментом. Кроме того, амплификация выполняется на стадии обозначенного воспроизведения с использованием запатентованной технологии фермент-амплификации. Визуально положительные пробы окрашиваются в желто-оранжевый цвет. Интенсивность окраски пропорциональна количеству антигена хламидий. Точный результат исследования определяют с помощью микроЭВМ, спектрофотометра “Мультискан” или другого аппарата для ИФА при длине волны 492 нм. Образцы дающие значения поглощения выше или равные значению отсекающего поглощения (cut-off), считаются положительными для хламидий. Чувствительность и специфичность ИФ методов соответственно составляет 65-70% и 90-100% . Показания к применению такие же, как и для метода прямой иммунофлюресценции. Выявление в сыворотке крови антител к липополисахаридному антигену хламидий классов Ig G, Ig A, Ig M с определением их титра позволяет определить стадию заболевания, обосновать необходимость антибактериального лечения и оценить его эффективность.Показания к выявлению антихламидийных антител классов Ig G, Ig А, Ig M в сыворотке крови методом ИФА1. Определение стадии заболевания;-острая, первичная;-хроническая;-реактивация или реинфекция;-состояние после реконвалесценции (остаточная серология).2.Оценка эффективности проводимого лечения (наряду с исследованием методами ПЦР, культурального посева).3.Установление хламидийной этиологии экстрагенитальных поражений (артриты, пневмонии, заболевания глаз).Сравнивая различные диагностические наборы, мы рекомендуем использовать тест-систему r-Elisa фирмы MEDAC DIAGNOSTICA (Германия). Регистрационное удостоверение Минздрава РФ 97 от 7.02.97 г. Это иммуноферментные наборы для выявления антихламидийных антител классов Ig G, Ig A, Ig M с определением их количественного титра в сыворотке крови по одной точке. Антиген получен методами генной инженерии. В качестве антигена твердой фазы используется специфические рекомбинантные липополисахаридные фрагменты хламидий, отсутствующие в липополисахаридах других бактерий. Выбирая тест-систему, где в качестве антигена используются липополисахаридные фракции, мы исходили из предположения, что обследуемое лицо может в течении жизни подвергаться инфицированию не только *C.trachomatis,* но и *С.pneumonia ,* и *C.psitacci с* выработкой к ним соответствующих антител. Выявление их количественного титра и его динамики является важнейшим показателем эффективности проводимого лечения.В промежутке между пятым и двадцатым днями после появления клинических симптомов заболевания последовательно возникают антитела этих трех классов к специфическому хламидийному липополисахариду. Ig M является маркером острой стадии, он определяется уже через пять дней после начала заболевания. Изменения продуцирования Ig M на определяемое продуцирование Ig А может происходить в течение 10 дней после появления симптомов заболевания. В течение короткого периода могут одновременно присутствовать Ig M и Ig А. В это же время или с небольшой задержкой - 2-3 недели могут быть определены Ig G. Прогрессирование заболевания, переход в хроническую стадию характеризуется появлением Ig A. Ig G- антител (смотри таблицу 3).Таблица 3. Определение стадии заболевания на основании выявления антител классов Ig G, Ig A, Ig M

|  |  |
| --- | --- |
| Стадия заболевания | Классы антител |
| Острая | Ig G, Ig А, Ig M |
| Хроническая | Ig A\*, Ig G |
| Реактивация или реинфекция | Ig A\*, Ig M |
| Состояние после реконвалесценции | Ig G |

\*-при недостоверном определении титра Ig А подтверждение осуществляется при помощи определения Ig M.Для адекватной интерпретации результатов серодиагностики хламидиоза следует определять такое понятие как 'пограничные титры Это наименьшие возможные разведения в которых тест-системы определяют антитела против хламидий. “Пограничные титры” для Ig M - 1:50, Ig А-1:50, Ig G-1:100. Так называемые “диагностические титры” могут подтверждать клинический диагноз, стадию процесса необходимость назначения антибактериального лечения (смотри таблицу 4). При реинфекции и реактивации происходит скачкообразный подъем титров Ig G изменения титра Ig А идут параллельно с титром Ig M однако на более низком уровне. У лиц, не получающих в период реинфекции лечения, титр Ig G сохраняется на неизменном уровне. Выявление на протяжении длительного периода титра только Ig G указывает на состояние реконвалесценции после перенесенной хламидийной инфекции (“серологические шрамы”). Исследуя титры антител Ig G, Ig A, Ig M можно оценивать эффективность проведенного лечения в отдаленном периоде (через 1-1,5 месяца).В табл. 5-17 показана возможность определения стадии инфекционного процесса, показаний к антибактериальному лечению и вынесения заключения о наличии хламидииной инфекции на основании однократного или динамического определения титров антител IgG, IgA, IgM.Таблица 4. Диагностический диапазон титров антител Ig G, Ig А, IgM. Выявление на основе его оценки стадии заболевания, обоснованности назначения антибактериального лечения.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Стадия заболевания | Дипазон титров IgG | Диапазон титров IgA | Диапазон титров Ig M |
| Первичная/острая. Определяются Ig M | >100-6400 | > 50-1600  | > 50-3200 |
| Хроническая. Определяются Ig A | > 100-1600 | <50 | >50-200 |
| Реактивация/ Реинфекция. Определяются Ig G, Ig A | >100-51200 | >50-400 | <50 |
| Состояние после реконвалесценции. Определяется Ig G | > 100-400 | <50 | <50 |

Рассмотрим возможность определения стадии инфекционного процесса, показаний к антибактериальному лечению и вынесения заключения о наличии хламидийной инфекции на основании однократного или динамического определения титров антител Ig G, IgA, Ig M.Используя данные однократного исследования затруднительно вынести клиническое заключение (табл. 5), при исследовании сыворотки через 10-14 дней уже можно судить о наличии хламидийной инфекции и показании к назначению антибактериального лечения (табл. 6) или об их отсутствии (табл. 7)Таблица 5. Очень ранняя стадия инфекции (сомнительно). “Пограничные титры” в первой сыворотке

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Титр Ig G | Титр Ig А | Титр Ig M | Заключение о наличии хламидийной инфекции | Антибактериальное лечение |
| <100 | |<50 | |<50 | сомнительно | не показано |

 Таблица 6. Острая первичная инфекция. “Диагностические титры” во второй сыворотке через 10-14 дней

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Титр Ig G | Титр Ig А | Титр Ig M | Заключение о наличии хламидииной инфекции | Антибактериальное лечение |
| >200 | >=100 | =<50 | имеется | Показано |

 Таблица 7. Отсутствие хламидийной инфекции. “Диагностические титры” во второй сыворотке через 10-14 дней

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Титр Ig G | Титр Ig A | Титр Ig M | Заключение о наличии хламидийной инфекции | Антибактериальное лечение |
| <100 | <50 | <50 | отсутствует | не показано |

 При однократном определении титров антител (табл. 8) так же, как и в предыдущем наблюдении трудно однозначно вынести клиническое заключение Повторное обследование больного через две недели (табл. 9) позволяет судить о прогрессировании первичной инфекции либо реактивации и реинфекции. В другом случае (табл. 10) исследование сыворотки в динамике через две недели позволяет вынести заключение о персистенции антител и непоказанности антибактериального лечения Таблица 8. Ранняя стадия инфекции (сомнительно). Хроническое течение (сомнительно). “Пограничные титры в первой сыворотке”

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Титр Ig G | Титр Ig A | Титр Ig M | Заключение о наличии хламидийной инфекции | Антибактериальное лечение |
| 100 | 50 | <50 | Сомнительно (требуется подтверждение ПЦР и культуральным посевом) | не обязательно |

 Таблица 9. Прогрессирующая первичная инфекция. Реинфекция. Реактивация. Диагностические титры во второй сыворотке через 10-14 дней

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Титр Ig G | Титр Ig A | Титр Ig M | Заключение о наличии хламидийной инфекции | Антибактериальное лечение |
| >=400\* | >=200\* | <=50 | Имеется | показано |

\*- 4-х кратное повышение значимо только для Ig G и Ig А.Таблица 10. Хроническая персистенция антител без клинических проявлений. Диагностические титры во второй сыворотке через 10-14 дней.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Титр Ig G | Титр Ig A | Титр Ig M | Заключение о наличии хламидийной инфекции | Антибактериальное лечение |
| 100 | 50 | < =50 | Персистенция антител | не показано |

В следующем наблюдении (табл.11) можно сразу вынести заключение о первичной инфекции или о ее прогрессировании либо реактивации, реинфекции (табл.12) и, соответственно, показанности антибактериального лечения.Таблица 11. Первичная стадия. Диагностические титры в первой сыворотке

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Титр Ig G | Титр Ig A | Титр Ig M | Заключение о наличии хламидийной инфекции | Антибактериальное лечение |
| <100 | <50 | >=50 | Имеется | Показано |
| >=100 | >=50 | >=50 | Имеется | Показано |
| <100 | >=50 | >=50 | Имеется | Показано |

Таблица 12. Прогрессирующая первичная инфекция . Реинфекция. Реактивация. Диагностические титры первой сыворотки

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Титр Ig G | Титр Ig A | Титр Ig M | Заключение о наличии хламидийной инфекции | Антибактериальное лечение |
| >=400 | >=200 | <50 | имеется | показано |

В следующем наблюдении первичное исследование не дает оснований для выводов (табл.13), и только повторение его через две недели позволяет вынести заключение. Отсутствие изменения титра антител (табл.15) за указанный период времени свидетельствует о персистенции хламидий, вызывающих образование Ig А-антител и об отсутствии показаний к назначению антибактериального лечения. В другом случае (табл.14) увеличение в 2 раза титров Ig G и Ig A позволяет сделать вывод о присутствии хламидийной инфекции и наличии показаний к назначению антбактериального лечения.Таблица 13. Первичная инфекция (сомнительно). Реинфекция (сомнительно) . Реактивация (сомнительно) . “Пограничные титры” в первой сыворотке

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Титр Ig G | Титр Ig A | Титр Ig M | Заключение о наличии хламидийной инфекции | Антибактериальное лечение |
| <100 | 50-100 | <50 | Возможна | Сомнительно. Не обязательно |

Таблица 14. Первичная инфекция. Реинфекция. Реактивация. “Диагностические титры” во второй сыворотке через 10-14 дней

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Титр Ig G | Титр Ig A | Титр Ig M | Заключение о наличии хламидийной инфекции | Антибактериальное лечение |
| >=200 | >=200 | <50 | Имеется | Показано |

Таблица 15. Хроническая персистенция антител без клинических проявлений. Диагностические титры во второй сыворотке через 10-14 дней.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Титр Ig G | Титр Ig A | Титр Ig M | Заключение о наличии хламидийной инфекции | Антибактериальное лечение |
| <100 | 50-100 | <50 | Присутствует персистирующие хламидии, вызывающие образование IgA-антител. Клининическое значение неизвестно. | Не показано |

В случае обследования реконвалесцентов или при выявлении повышенных титров IgG, расценивающихся как “серологическая находка” (табл. 16), динамическое наблюдение через две недели в случае отсутствия 4-х кратного повышения титра Ig G позволяет вынести заключение о неинфицированности и непоказанности антибактериального лечения (табл. 17)Таблица 16. Состояние после реконвалесценции - “остаточная серология” (сомнительно). Пограничные титры в первой сыворотке.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Титр Ig G | Титр Ig A | Титр Ig M | Заключение о наличии хламидийной инфекции | Антибактериальное лечение |
| >=10 | <50 | <50 | Сомнительно необходимы проведение ПЦР, культ. посева | Сомнительно |

Таблица 17. Состояние после реконвалесценции - “остаточная серология”. Диагностические титры во второй сыворотке через 10-14 дней.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Титр Ig G | Титр Ig A | Титр Ig M | Заключение о наличии хламидийной инфекции | Антибактериальное лечение |
| >=100\* | <50 | <50 | Отсутствует | Не показано |

\* - в случае отсутствия 4-х кратного повышения титра между первой и второй сыворотками. Если это повышение имеется, то отмечается текущая инфекция. С января 1999 г. на российском рынке появились тест-наборы С. trachomatis Ig G и Ig A pELISA medac. Они используют синтетический пептид из иммунодоминантной области МОМР. С помощью этого высокоспецифичного антигена возможно выделение С. trachomatis - специфических антител с высокой чувствительностью среди общих антихламидийных антител с высокой степенью чувствительности.Преимущества теста:-отсутствие ложноположительных результатов, обусловленных межвидовой перекрестной реакцией хламидий;-отсутствие инфицированного антигенного материала;-химически точная структура антигена;-наличие стрипов позволяет экономично использовать тесты;-пригоден для использования на автоматических открытых системах для ИФА. ЗАО "Вектор-Бест" (Новосибирск) производит следующие тест-системы для диагностики хламидиоза методом ИФА:- ХламиБест-Ig G-стрип для выявления иммуноглобулинов классов G к С. trachomatis и С. psittacci в сыворотке крови ;- ХламиБест-Trachomatis Ig G-стрип. Тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса G к Chlamydia trachomatis в сыворотке (плазме)крови;-ХламиБест-Ig M - стрип. Тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса М к Chlamydia trachomatis и Chlamydia psrttaci;- ВектоХлами-антиген-стрип. Тест-система для выявления антигена Chlamydia trachomatis. Хромоген-ОФД.-ВектоХлами-антиген-стрип. Тест-система для выявления антигена Chlamydia trachomatis. Имеются реактивы различных фирм для экспресс-диагностики хламидийной инфекции, учет реакции через 10-15 минут визуальный. Однако чувствительность этих методов невысока - 50-60%, они могут быть использованы только для скриннинговых исследований.  |

 |
|

|  |
| --- |
| *Диагностика хламидий на культуре клеток МсСоу*Одним из лучших, но в то же время наиболее трудоемким является метод диагностики хламидий путем изоляции возбудителя на культуре клеток, обработанных различными антиметаболитами (“золотой стандарт”) Для этой цели обычно используют чувствительную культуру клеток, обработанную циклогексимидом. Чувствительность культурального метода по сравнению с ПЦР составляет 70-80%, но в то же время он превосходит молекулярно-биологические методы диагностики по специфичности. В литературе описаны случаи выявления хламидий трахоматис методом ПЦР при отрицательных результатах культурального теста и наоборот.Показаниями для диагностики хламидийной инфекции этим методом являются:1 Беременность с отягощенным акушерским анамнезом.2. Оценка эффективности проведенного антибактериального лечения.3. Выявление чувствительности и резистентности к антибактериальнымпрепаратам.4. Выявление хламидий у ВИЧ-инфицированных или лиц со вторичными иммунодефицитными состояниями (онкологические больные после проведенных курсов лучевой и химиотерапии, трансплантации костного мозга; лица, получающие иммунодепрессанты; больные вирусным гепатитом и туберкулезом).5. Бесплодие неясного генеза.6. Установление этиологии хронического инфекционного процесса урогенитального тракта.Культуральный посев является референс-методом при оценке эффективности антибактериального лечения. При исследовании биопроб методом ПЦР после курса химиотерапии в некоторых случаях можно получить “ложноположительные с клинической точки зрения” результаты. Это связано с тем, что невозможно однозначно оценить жизнеспособность и патогенность микробной клетки на основании выявления фрагмента ее генома, используя только данные молекулярно-биологических методов. В этом случае при исследовании клинического материала с помощью культурального посева микробные клетки, потерявшие эти важные с клинической точки зрения свойства, не дадут роста в клеточной культуре.Для транспортировки и хранения клинического материала используют специальную питательную среду (транспортная среда). Она разливается в пенициллиновые флаконы по 1 мл и хранится при температуре + 4 ° С (в общей камере бытового холодильника) в течение 2-х месяцев. Состав транспортной среды: среда MEM с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота и антибиотика гентамицина концентрации 50 мкг/мл .Клинический материал после перенесения в транспортную среду хранится в общей камере холодильника при температуре + 4 ° С и, в течение двух суток должен быть доставлен в лабораторию.Процедура посева1. Обработка однодневной клеточной культуры МсСоу 1% раствором ДЕАЕ декстраном в течение 30 минут.2. Заражение обработанных клеток материалом, полученным от больных.3. Центрифугирование зараженных клеток при 2500 g в течение 45 минут.4. Отмывка клеток питательной средой.5. Добавление к клеткам ростовой среды, содержащей циклогексимид.6. Инкубирование клеток в течение двух суток при +36 ° С.7. Обнаружение хламидий в клетках методом прямой иммунофлюоресценции или ПЦР.Реальный срок получения результатов этим методом - семь дней. В настоящее время в литературе растет число сообщений о случаях резистентности хламидий к антибактериальным препаратам (эритромицину, тетрациклину, доксициклину, фторхинолонам). Ценность культурального метода состоит в том, что он является пока единственным методом, позволяющим выбрать антибактериальный препарат для лечения хламидийной инфекции и оценить эффективность антибактериальной терапии.Схема метода выявления устойчивости хламидий трахоматис к антибактериальным препаратам-Хламидийным изолятом, выделенным от больного при посеве, заражают чувствительные клетки.-К зараженным клеткам добавляют ростовую среду, содержащую антибиотик.-Зараженные клетки инкубируют 5 дней при температуре + 36 ° С.-Чувствительность хламидий к антибиотику определяется по подавлению инфекции в зараженных клетках. Процедура длительная, занимает по времени две недели.  |

 |
|

|  |
| --- |
| *Диагностика Chlamydia trachomatis методом полимеразной цепной реакции*Дороговизна, длительность и трудоемкость микробиологического выделения хламидий в культуре существенно затрудняет использование этой процедуры в рутинной лабораторной диагностике. В литературе накоплен обширный клинико-лабораторный опыт по использованию метода ПЦР для выявления хламидий трахоматис. Особое внимание при его использовании следует уделять, без сомнения, вопросам правильной интерпретации получаемых результатов. Экстремально высокие показатели чувствительности и специфичности ПЦР делают эту методику во многом революционной в лабораторной диагностике. Основными мишенями при выявлении хламидий трахоматис являются нуклеотидная последовательность видоспецифической криптической плазмиды, последовательность главного белка внутренней мембраны, рибосомальные гены.Данная реакция представляет собой многократно повторяющиеся циклы синтеза (амплификацию) специфической области ДНК-мишени в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы, дезоксинуклеотидтрифосфатов, соответствующего солевого буфера и олигонуклеотидных затравок-праймеров, определяющих границы амплифицируемого участка. Каждый цикл состоит из трех стадий с различными температурными режимами. На первой стадии при 94 ° С происходит разделение цепей ДНК, затем при 56-58 ° С - присоединение (отжиг) праймеров к комплементарным последовательностям на ДНК-мишени, и при температуре 72 ° С протекает синтез новых цепей ДНК путем достраивания цепей праймеров в направлении 5’ –3’ . В каждом цикле происходит удвоение числа копий амплифицируемого участка, что позволяет за 25-40 циклов наработать фрагмент ДНК, ограниченный парой выбранных праймеров, в количестве, достаточном для ее детекции с помощью электрофореза или альтернативными ему технологиямиПо сравнению с широко применяющимися иммунологическими тестами ПЦР-диагностика обладает рядом преимуществ:-высокой и регулируемой специфичностью, обусловленной лишь нуклеотидной последовательностью, применяемой в данной диагностической системе;-высокой чувствительностью, позволяющей диагносцировать не только острые, но и латентные инфекции (возможно выявление даже единичных бактерий или вирусов);-химическое сходство всех нуклеиновых кислот позволяет разрабатывать универсальные процедуры для выявления различных инфекционных агентов,-возможностью идентификации возбудителя в течении 4,5-5 часов. Доставка биоматериала в ПЦР-лабораторию производится в холодовом термоконтейнере или термосе со льдом. Важной отличительной особенностью ПЦР-диагностики является относительно низкая стоимость оборудования для проведения анализа, сочетающаяся с универсальностью метода, что позволяет выявлять весь спектр клинически актуальных инфекционных агентов. ПЦР-лаборатория должна быть разделена на зоны (комнаты). Следует иметь не менее двух комнат-пре-ПЦР-помещение, где проводится обработка клинических образцов, выделение ДНК, приготовление реакционной смеси для ПЦР и постановка ПЦР (при наличии условий два последних этапа рекомендуется также проводить в дополнительном отдельном помещении), в этих помещениях запрещается проводить все другие виды работ с инфекционными агентами (микробиологический анализ, ИФА, другие диагностические тесты), ПЦР-диагностика которых проводится в данной лаборатории.-пост-ПЦР-помещение, где проводится детекция продуктов амплификации, в ПЦР-помещении допускается использовать другие методы детекции инфекций, диагностика которых проводится в данной лаборатории. Комнату детекции продуктов амплификации (пост-ПЦР-помещение) следует располагать как можно дальше от пре-ПЦР-помещений. Следует исключить движение воздушного потока из пост-ПЦР-помещения в пре-ПЦР-помещение.В комнате приготовления реакционной смеси и в комнате обработки клинических образцов должны быть установлены ультрафиолетовые лампы, рабочие поверхности в лаборатории должны обрабатываться дезинфицирующими растворами .Показания для диагностики С. trachomatis методом ПЦР1. Острая фаза заболевания2. Хроническая фаза заболевания3. Установление этиологии хронического инфекционного процесса урогенитального тракта.4. Беременность с отягощенным акушерским анамнезом. 5 Бесплодие неясного генеза.6. Контроль эффективности проведенного антибактериального лечения.В случае выявления фрагмента ДНК хламидии трахоматис после курса химиотерапии следует провести культуральную диагностику для исключения “ложноположительного с клинической точки зрения результата”. Если проведение культуральной диагностики невозможно, то необходимо через 5-6 недель (полное обновление эпителиального покрова мочеполовых путей) провести повторное исследование методом ПЦР.7. Выявление хламидии у ВИЧ-инфицированных лиц, больных туберкулезом, вирусным гепатитом и со вторичными иммунодефицитными состояними (онкологические больные после курсов химио- и лучевой терапии, трансплантации костного мозга, получающие иммуносупрессивную терапию).В 1991 году компания Хоффман-ла Рош ЛТД получила от компании Cetus права и патенты на использование ПЦР. В этом же году была создан Roche Molecular Systems, занимающийся исключительно вопросами развития и совершенствования ПЦР. В 1992 году были внедрены первые стандартизованные тест-системы для клинической ПЦР-диагностики AMPLICOR Chlamydia trachomatis, а в 1993 году начато производство этих тест систем. Многочисленные проведенные исследования показали высокую чувствительность и специфичность данного набора. Это позволило получить данной тест-системе сертификат Food and Drug Administration (FDA) в 1993 году. В 1995 году появился новый набор AMPLICOR *Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae* для одновременной их детекции в одной пробирке. В тесте использованы биотинилированные праймеры (СР24/СР27) из криптической плазмиды С. trachomatis. Чувствительность теста составляет 10 копий/мл, специфичность 99,6%. Тест-система включает: набор для сбора и транспортировки образцов, набор для выделения ДНК из цервикальных, уретральных образцов и мочи, набор для амплификации и детекции. Все наборы стандартизованы, полностью готовы к использованию, имеют внутренний контроль, систему защиты от контаминации.Научно-производственной фирмой "Литех" при НИИ физико-химической медицины МЗ РФ выпускается набор реагентов "Полимик" в виде трех отдельных наборов для определения соответственно *Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealiticum.* Каждый набор “Полимик” комплектуется отдельным набором для выделения ДНК из биопроб. Инструкция по применению набора реагентов рекомендована к утверждению экспертной комиссией Комитета по новой медицинской технике МЗ РФ (протокол No 3 от 18.03.96 г.) и утверждена Министерством здравоохранения РФ 17.05.96 г. (ТУ 9398-405-17253567-96).В состав реакционной смеси набора “Полимик” входит внутренний контроль (рекомбинантная плазмида, содержащая фрагмент-вставку размером 308 н.п.). Этот компонент позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации, а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих ПЦР. Полоса, соответствующая внутреннему контролю, должна проявляться как в положительном и в отрицательном контролях, так и во всех тестируемых пробах.При выделении ДНК из биопробы (“Набор для выделения ДНК”) используется метод экстракции ДНК из клеток хламидий с помощью гуанидина тиоцианата и связывания высвобождающихся нуклеиновых кислот с частицами крупнопористого стекла. Это позволяет оптимизировать условия выделения и подготовки проб для амплификации, а также уменьшить количество манипуляций с образцом. При этом все манипуляции проводятся в одной пробирке. Выход хромосомной ДНК составляет 70-80% по результатам определения числа колониеобразующих единиц клеток *Acholeplasma laidlawii* (штамм микоплазм, взятый в качестве стандарта) как в случае чистой культуры, так и при добавлении этих клеток к клиническому материалу, не содержащему определяемых инфекционных агентов.После завершения ПЦР продукты амплификации фракционируют методом электрофореза в 1,5% агарозном геле.Анализ результатов диагностики1. В положительном контрольном образце для хламидий выявляется полоса размером 501 н.п.2. В отрицательном контрольном образце полоса, соответствующая фрагментам генома хламидий, должна отсутствовать. Появление полосы в отрицательном контроле свидетельствует о контаминации компонентов набора.3. В анализируемой пробе отсутствие полосы строго на уровне соответствующего контроля свидетельствует об отсутствии возбудителя в пробе, наличие полосы, соответствующей по электрофоретической подвижности положительному контролю, свидетельствует о наличии хламидий в клинической пробе.4. Во всех образцах выявляется полоса оранжево-красного цвета, соответствующая внутреннему контролю размером 308 н.п. Полученные результаты можно документировать фотографированием гелей с использованием оранжевого или интерференционного (594 нм) светофильтра. При использовании видеосистемы "Gel-doc" возможно документирование результатов электрофореза в виде компьютерного файла, доступного любым приложениям “Windows”.Набор “Полимик” следует хранить при температуре - 18-20 ° С в течение всего срока годности (6 месяцев). Допускается, хранение и транспортировка набора при температуре не выше 0 ° градусов не более одних суток.По состоянию на третий квартал 1999 г. Минздравом России помимо набора “Полимик” разрешены следующие диагностические наборы для обнаружения хламидий трахоматис методом ПЦР в качестве изделий медицинского назначения:набор реагентов амплификационный для определения ДНК хламидий (Хламидия-Ампли-тест) ТУ 9398-402-18137053-96 производства АО “ВНЦМДЛ”, Москва;набор реактивов для выявления нуклеотидных последовательностей хламидия трахоматис методом ПЦР (Хлам Ам) ТУ “9398-403-29032954-96 производства ЗАО “Внедрение систем в медицину”. Москва,набор реагентов для выявления ДНК хламидий трахоматис методом ПЦР (Хлам-Ген) ТУ 9398-412-46482062-97 производства НПФ “ДНК-технология”, Москва. |

 |
|

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| *Достоинства и недостатки различных методов обнаружения Chlamydia trachomatis*(Taylor-Robinson О., Thomas B.J ,1991, с дополнениями Говорун В.М, Бочкарев Е.Г., Парфенова Т.М., 1999)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Характеристика/ Метод | ПИФ | Культуральный посев | ИФА-методы | ПЦР |
| Исследуемый материал | Любой | Большинство | Ограничения из-за неспецифичности реакций | Любой |
| Значение правильно взятых проб | Решающее | Решающее | Решающее | Решающее |
| Условия транспортировки проб | Если препарат фиксирован -условия не важны | Быстрая доставка или хранение при низкой температуре | Не имеет значения, если проба взята в буфер | Быстрая доставка или хранение при низкой to менее важно, чем для культуры клеток |
| Условия хранения | На короткое время при +4°С длительно при -20 °С | +4°С - сутки-двое. Длит хранение в жидком азоте | 3 -5 дней при +4°С Замораживание снижает чувствительность | На короткое время + 4°С, две недели - 20°С Длительное время - в жидком азоте |
| Проверка адекватности взятия материала | Мазки оценивают во время тестирования | Не практикуется | Не практикуется | Определяется, присутствует ли ДНК. |
| Потребность в специальном оборудовании | Люминесцентный микроскоп | Центрифуга | Комплект для ИФА | Амплификатор и оборудование для электрофореза |
| Обработка проб | Простая | Трудоемкая | Становится проще для новых тестов | Требует строгой предосторожности, чтобы не контаминировать ДНК |
| Чтение результатов | Субъективное и утомительное | Субъективное умеренно утомительное | Объективное, Простое | Объективное, простое |
| Время выполнения | 30 минут | 12-72 часа | 3 часа | 4,5-5 часов |
| Способы проверки результатов | Повторный просмотр | Повторный просмотр | Повторение теста | Повторная проба или переваривание эндоуклеазой |
| Результат зависит от следующих причин: | Опыта микроскописта | Чувствительности клеточной культуры | Присущей мощности теста | Требует хорошего контроля и отсуствия контаминации |
| Способность к поддержанию штамма | Нет | Да | Нет | Нет |
| Использование как контроля эффективности лечения | Ограничено | Рекомендуется | Ограничено | Рекомендуется с ограничениями |

 |

 |