

ГП «Научно-технический центр иммунобиотехнологий»
НТК „Институт монокристаллов”
Национальной академии наук Украины
Научно-производственная компания “Диапроф-Мед”

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
по работе
с иммуноферментной тест-системой
для определения противохламидийных антител
(DIA-Chlamydia)

Киев - 2004

УДК 616.98-07:578.826.6

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ по работе с
иммуноферментной тест-системой для определения
противохламидийных антител (DIA-Chlamydia).

Под редакцией профессора Н.Я. Спивака

Авторы: Иванская Н.В., Руденко А.В.,
Кругликов В.Т., Раевская Г.Е., Касьяненко Т.В.,
Мизецкая Т.И., Шеховцов В.А.

Киев, “Диапроф-Мед”, 2004

Содержание

Сокращения, использованные в тексте пособия	3
Вступлениe	5
Классификация и биологические особенности хламидий	7
Антигенный состав хламидий	10
Методы лабораторной диагностики	12
Специфические антитела при хламидийной инфекции	17
Методика проведения ИФА на тест-системе „DIA-Chlamydia”	22
Характеристика показателей качества тест-системы „DIA-Chlamydia”	33
Литература	36

Сокращения, использованные в тексте пособия:

АГ – антиген;	АТ – антитело;	ВЛГ – венерическая лимфогранулёма;	ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;	ГЗ – граничное значение (оптической плотности);	ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;	ДЭАЭ-декстран – диэтиламиноэтилдекстран;	ИТ – инициальные тельца (хламидий);	ИФА – иммуноферментный анализ;	ЛПС – липополисахарид;	МЗ – Министерство здравоохранения;	МКА – моноклональные антитела;	ММ – молекулярная масса;	НИИ – научно-исследовательский институт;	ОБВО – основной белок внешней оболочки (мембраны) хламидий (= МOMP);	о.е. – оптическая единица;	ОП – оптическая плотность;	ОП _{ср} К ⁻ – среднее значение оптической плотности для проб отрицательного контроля;	ОГ _{ср} IgG К ⁺ и ОГ _{ср} IgA К ⁺ – среднее значение оптической плотности для проб положительного контроля;	ПЦР – полимеразная цепная реакция;	ПЭГ – полиэтиленгликоль;	РИФ – реакция иммунофлюоресценции;	РНИФ – реакция непрямой иммунофлюоресценции;	РНК – рибонуклеиновая кислота;	РПИФ – реакция прямой иммунофлюоресценции;	РСК – реакция связывания комплекса;	РТ – ретикулярные тельца (хламидий);	ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;	ЭТ – элементарные тельца (хламидий);	CDC (U.S.A. Centers for Disease Control and Prevention) – Центры США по проблемам контроля и предупреждения заболеваний;	CV – коэффициент вариации;
---------------	----------------	------------------------------------	--	---	---------------------------------------	--	-------------------------------------	--------------------------------	------------------------	------------------------------------	--------------------------------	--------------------------	--	--	----------------------------	----------------------------	---	---	------------------------------------	--------------------------	------------------------------------	--	--------------------------------	--	-------------------------------------	--------------------------------------	-------------------------------------	--------------------------------------	--	----------------------------

DIA Units (DU) – единицы, выражающие концентрацию антител в ИФА при работе с тест-системой DIA-Chlamydia для определения противохламидийных антител;
 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – твердофазный иммуноферментный анализ;
 FDA (USA Food and Drug Administration) – Агентство США по вопросам продовольствия и медикаментов;
 IgA – иммуноглобулины класса A;
 IgG – иммуноглобулины класса G;
 IgM – иммуноглобулины класса M;
 МOMP (major outer membrane protein) – основной белок внешней оболочки (мембраны) хламидий (=ОБВО).

Информационные материалы ЗАО «Медико-биологический союз», 2003, 26 с.

13. Tihje J.H., Roosendaal R., MacLaren D.M., Vanderbroucke-Grauls C.M. Improvement of growth of Chlamydia pneumoniae on HEp-2 cells by pretreatment with polyethylene glycol in combination with additional centrifugation and extension of culture time. – J.Clin.Microbiol. – 1997. – V.35 – N 7 – 1883-1884.
14. Gibson J.P., Egeer R.M., Wiedbrauk D.L. Improved isolation of Chlamydia trachomatis from a low-prevalence population by using polyethylene glycol. – J.Clin.Microbiol. – 1993. – V.31. – N2. – 292-295.
15. Rothburn M.M., Mallinson H., Mutton K.J. False-positive ELISA for Chlamydia trachomatis recognized by atypical morphology on fluorescent staining. – Lancet. – 1986. – N 5813. – P.982-983.
16. Mahony J.B., Luinstra K.E., Waner J., et al. Interlaboratory agreement study of a double set of PCR plasmid primers for detection of Chlamydia trachomatis in a variety of genitourinary specimens. – J.Clin.Microbiol. – 1994. – V.32. – N 1. – P.87-91.
17. Stephens R.S. et al. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: Chlamydia trachomatis. – Science. – 1998. – V.282. – 754-759.
18. Poussin M., Fuentes V., Corbel C. et al. Capture ELISA: a new assay for the detection of immunoglobulin M isotype antibodies using Chlamydia trachomatis antigen. – J.Immunol.Methods. – 1997. – V/204. – 1-12.

Вступление

В последнее время хламидийная инфекция как возбудитель заболеваний у взрослых и детей все более привлекает внимание специалистов разного профиля. Усовершенствование методов диагностики дает возможность по-новому оценить роль хламидий в патологических процессах.

Существова в течение тысячелетий с разнообразными хозяевами, хламидии выработали действенные средства для сохранения своей популяции и обеспечили для себя широкую циркуляцию в природе; эти возбудители обнаружены примерно у 200 видов теплокровных, включая и человека, а также у рыб, земноводных, моллюсков и членистоногих.

Хламидии – причина многих заболеваний самой разнообразной локализации. Одни только бивары А, В и С *Chlamydia trachomatis* заражают ежегодно 500 млн. чел.; примерно у 400 млн. из них развивается трахома, а до 7 млн. чел. слепнут [1-2]. Взаимодействуя с другими биотическими и абиотическими факторами, особенно при ассоциациях с разными микроорганизмами, хламидии нередко отвечают и за летальные случаи заболеваний.

Разнообразные хламидийные инфекции человека, например, трахома, конъюнктивиты, пситтакоз, хламидийная пневмония и венерическая лимфогранулёма (ВЛГ), известны очень давно. Для современной эпидемиологии наибольшее значение имеет *Ch. trachomatis*. Этот возбудитель вызывает многочисленные урогенитальные заболевания (так называемые “неспецифические” уретриты, эпидидимиты, простатиты, цервициты), ВЛГ, эндемическую трахому, синдром Рейтера. Воспалительные процессы в органах малого таза приводят к ложной беременности, бесплодию, преждевременным родам и рождению мертвых детей у зараженных женщин. Хламидиозы – виновники импотенции и бесплодия у мужчин. У новорожденных хламидии вызывают конъюнктивиты и пневмонии [2, 4-5].

По данным экспертов ВОЗ, среди болезней, передающихся половым путем, хламидийная инфекция занимает по распространенности второе место [2-3]. Многочисленные заболевания, вызванные хламидиями, передаются чаще всего не

Литература

1. Крогов С.А., Крогова В.А., Юрьев С.Ю. Хламидиозы: эпидемиология, характеристика возбудителя, методы лабораторной диагностики, лечение генитального хламидиоза. – Реф. сообщение. – Кольцово, 1997, 63 с.
2. Бочкарев Е.Г., Ю.В.Сергеев, М.А.Башмакова и др. Хламидиоз: современные подходы к диагностике и лечению (пособие для врачей). – 2002. – <http://www.iaci.ru/b/cover.htm>
3. Мавров И.И. Хламидийные инфекции урогенитального тракта. – В кн.: «Венерические болезни». – М.: «Медицина». – 1991. – С.390-412.
4. Гранитов В.М. Хламидиозы. – М.: «Медицинская книга», Н.Новгород: Издательство НГМА. – 2002. – 192 с.
5. Кудрявцева Л.В., Мисюрина О.Ю., Генерозов Э.В. и др. Клиника, диагностика и лечение хламидийной инфекции (пособие для врачей). Москва, 2001. – 40 с. – <http://www.lytech.ru/Main/methchlamyid.htm>
6. Standberry L.R., Bernstein D.I. Sexually Transmitted Diseases: Vaccines, Prevention and Control. – Academic Press. – San-Diego – New-York – San-Francisco – Boston – London – Sydney – Tokyo. – 2000. – 468 pp.
7. Black C.M. Current methods of laboratory diagnostics of *Chlamydia trachomatis* infection. – In the “Clinical Microbiology Reviews”. – 1997. – pp. 160-184.
8. Бочкарев Е.Г. Лабораторная диагностика хламидийной инфекции. – 2002. – 38 с. – <http://www.nature.ru/db/msg.html?mid>
9. Скрипкин Ю.К., Кубанова А.А., Дмитриев Г.А. и др. Современные подходы к диагностике хламидиоза. – Вестн.дерматол.венерол.- 1996. - № 4. – 26-28.
11. Barnes R.C. Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. Clin. Microbiol.Revs, April 1989, p. 119-136.
12. Манзенюк И.Н., Воробьева М.С. *Chlamydia trachomatis*. Сообщение 1. Современные представления о возбудителе. Серодиагностика. – Новосибирск:

при бытовых контактах, а именно половым путем. Ежегодно в мире регистрируют 89 млн. новых случаев урогенитального хламидиоза, причем почти все они приходятся на возрастные группы населения с самой высокой сексуальной активностью. Одно из серьезнейших последствий хламидиоза – нарушение репродуктивной функции. Серьезного внимания заслуживает урогенитальный хламидиоз беременных, регистрируемый в 10-40 % случаев. В этом случае вероятность передачи хламидийной инфекции ребенку составляет 40-50 %. У 84,4 % детей, инфицированных *Ch. trachomatis* внутриутробно, развиваются: повторные риниты, назофарингиты, вульвиты, конъюнктивиты, заболевания желудочно-кишечного тракта, отиты. Кроме того, высок риск прерывания беременности на ранних сроках, поэтому каждая беременная нуждается в обследовании на хламидиоз.

Точно оценить распространенность *Ch. trachomatis* как причины воспалительных процессов малого таза трудно из-за обычно незаметного (бесимптомного и субклинического) течения инфекции более чем у 70 % зараженных женщин. Чаще всего первым признаком заражения становится бесплодие. Проведенные исследования доказывают, что 20-40 % женщин детородного возраста контактировали с возбудителем, т.к. в крови их обнаруживаются антитела против *Ch. trachomatis* [4, 6].

Особенности биологии хламидий проявляются в способности их к персистенции, частому формированию хронических форм заболевания. Значительная роль принадлежит хламидиям в патологии беременности, плода и новорожденных детей. Поэтому хламидиозы относятся к категории важных медико-социальных проблем.

В Украине хламидийные инфекции представляют серьезную проблему. Отсутствие регистрации и надлежащей лабораторной диагностики хламидиозов пока что не дают возможности точно определить их частоту в нашей стране. Однако по данным Украинского НИИ дерматологии и венерологии МЗ Украины, заболеваемость урогенитальным хламидиозом в стране в несколько раз превышает заболеваемость гонорей и другими венерическими болезнями.

Согласно указу Президента Украины (№ 203/2001 от 26.03.2001г.), создана Национальная программа

Таблица 4 - Результаты контроля тест-системы “DIA-Chlamydia” на стандартной панели сыворонок, содержащих и не содержащих антитела класса IgG против *Ch. trachomatis*.

№	Наименование тест-систем			Интерпретация результата
	Ch. trachomatis IgG-pELISA Medac ОПЛГЗ	SeroCT-IgG Savyon ОПЛГЗ	DIA-Chlamydia Диапроф-Мед ОПЛГЗ	
1	0.25	0.77	0.23	Негативный
2	0.33	0.41	0.56	Негативный
3	0.54	0.33	0.23	Негативный
4	0.76	0.45	0.68	Негативный
5	0.12	0.54	0.18	Негативный
6	0.30	0.75	0.11	Негативный
7	0.18	0.37	0.13	Негативный
8	0.35	0.58	0.12	Негативный
9	0.18	0.31	0.24	Негативный
10	0.34	0.58	0.16	Негативный
11	0.37	0.64	0.12	Негативный
12	0.26	0.65	0.06	Негативный
13	0.07	0.57	0.62	Негативный
14	0.57	0.52	0.14	Негативный
15	0.28	0.47	0.13	Негативный
16	0.19	0.38	0.78	Негативный
17	0.30	0.75	0.33	Негативный
18	0.16	0.55	0.14	Негативный
19	0.82	0.54	0.09	Негативный
20	0.68	0.71	0.11	Негативный
21	1.62	1.02	5.6	Позитивный
22	2.55	1.55	20.7	Позитивный
23	1.72	1.95	15.6	Позитивный
24	1.84	1.43	18.9	Позитивный
25	1.62	1.26	23.8	Позитивный
26	6.18	7.68	23.0	Позитивный
27	1.93	3.04	6.1	Позитивный
28	1.12	2.37	21.0	Позитивный
29	1.39	1.73	3.9	Позитивный
30	1.92	3.07	2.4	Позитивный
31	1.90	1.20	9.7	Позитивный
32	1.14	1.43	4.9	Позитивный
33	1.04	1.73	1.6	Позитивный
34	3.67	1.63	13.9	Позитивный
35	1.22	1.49	5.8	Позитивный
36	2.58	2.07	5.2	Позитивный

Таблица 3 - Результаты контроля тест-системы “DIA-Chlamydia” на стандартной панели сыворонок, содержащих и не содержащих специфические антитела класса IgA против *Ch. trachomatis*.

№ образца	Наименование тест-систем				Интерпретация результата
	Chlamydia trachomatis IgA-rELISA Medac	SeroST-IgA Savuon	DIA-Chlamydia ДиапрофМед		
			ОП/ГЗ	ОП/ГЗ	
1	0,39	0,69	0,18	0,18	Негативный
2	0,28	0,47	0,09	0,09	Негативный
3	0,22	0,24	0,14	0,14	Негативный
4	0,25	0,25	0,15	0,15	Негативный
5	0,62	0,42	0,29	0,29	Негативный
6	0,70	0,51	0,4	0,4	Негативный
7	0,61	0,21	0,1	0,1	Негативный
8	0,46	0,49	0,25	0,25	Негативный
9	0,59	0,59	0,34	0,34	Негативный
10	0,49	0,42	0,14	0,14	Негативный
11	0,48	0,21	0,15	0,15	Негативный
12	0,71	0,50	0,05	0,05	Негативный
13	0,26	0,27	0,16	0,16	Негативный
14	0,38	0,65	0,17	0,17	Негативный
15	0,60	0,36	0,46	0,46	Негативный
16	0,35	0,33	0,14	0,14	Негативный
17	0,28	0,27	0,45	0,45	Негативный
18	0,35	0,34	0,19	0,19	Негативный
19	1,02	1,10	1,86	1,86	Позитивный
20	1,92	3,95	2,9	2,9	Позитивный
21	2,76	2,76	10,0	10,0	Позитивный
22	1,36	1,08	3,5	3,5	Позитивный
23	1,26	1,03	5,7	5,7	Позитивный
24	1,12	1,03	2,6	2,6	Позитивный
25	1,04	1,03	3,1	3,1	Позитивный
26	3,73	5,81	18,4	18,4	Позитивный
27	1,10	1,56	3,9	3,9	Позитивный
28	5,76	3,82	3,9	3,9	Позитивный
29	1,18	1,06	3,2	3,2	Позитивный
30	1,44	1,08	1,7	1,7	Позитивный

“Репродуктивное здоровье 2001-2005”, направленная на улучшение демографической ситуации в стране, обеспечение репродуктивного здоровья населения, охраны материнства и детства и укрепления семьи. Основные задачи Программы – это, в частности, улучшение качества и доступности медицинской помощи, оказываемой с целью охраны репродуктивного здоровья; осуществление мероприятий по профилактике заболеваний, передающихся половым путем.

Для диагностики хламидийной инфекции научно-производственная компания “Диапроф-Мед” выпускает иммуноферментную тест-систему “DIA-Chlamydia” для обнаружения иммуноглобулинов класса G и/или класса A человека против *Chlamydia trachomatis*.

Классификация и биологические свойства хламидий

Хламидии – это патогенные грамотрицательные бактерии; все виды хламидий – своеобразные анаэробные «энергетические» паразиты разнообразных клеток-хозяев; у них открыт уникальный цикл внутриклеточного развития и общий родоспецифический антиген¹ [6-8].

В течение последних лет классификацию хламидий пересматривали и уточняли на основе всё новых известных подробностей их строения и развития, а также их молекулярно-биологических особенностей. Согласно современному подходу к классификации хламидий и геносистематики, классификация хламидий и хламидиеподобных микроорганизмов основана на гомологии их геномных ДНК и нуклеотидных последовательностей 16S- и 23S-рРНК. Благодаря этому в составе класса *Chlamydiales* было классифицировано ряд хламидиеподобных организмов и изменены родовые названия некоторых возбудителей, относимых ранее к роду *Chlamydia*. Ныне этот род включает только давно известный и очень важный с точки зрения эпидемиологии (из-за половой передачи от человека и человеку)

¹ Создается впечатление, что его следует назвать, в связи с новой классификацией, по крайней мере семейство-специфичным антигеном, т.к. он присутствует и у представителей рода *Chlamydia*, и у представителей рода *Chlamydiaophila* семейства *Chlamydiaceae*.

вид *Ch. trachomatis* и два новых вида – *Ch. suis* и *Ch. muridarum*. Другие представители семейства *Chlamydiaceae*, тоже очень важные с медицинской точки зрения, отнесены теперь к роду *Chlamydia*; это, в частности, *Ch. pneumoniae*, *Ch. psittaci*² и *Ch. pecorum* [5]. Не останавливаясь подробнее на систематике хламидийных возбудителей, вызывающих заболевания у самых разных животных, укажем только, что, вероятно, не все они передаются человеку от животных и причастны к возникновению определенных заболеваний человека, хотя вопрос об их патологической роли у человека лишь недавно поставлен на повестку дня.

В отличие от вирусов, хламидии содержат две нуклеиновые кислоты – и ДНК, и РНК³. Паразиты локализуются в цитоплазматических вакуолях клетки, не вступая в непосредственный контакт с клеточным геномом. Для хламидий характерно отсутствие “скрытого” периода (так называемой лаг-фазы размножения); их находят в клетке в течение всего периода паразитирования. Имея собственную ДНК-зависимую РНК-полимеразу, ряд ферментов катаболизма глюкозы и некоторые ферменты, необходимые для дыхания, хламидии лишены цитохрома, а потому не способны создавать и использовать макроэнергетические соединения, и в отношении многих метаболитов всецело зависимы от хозяина.

Другие особенности хламидий – склонность к существованию в латентном состоянии и к длительной персистенции в клетках зараженных организмов; сохранение инфекционности содействует широкой передаче возбудителя в пределах одного вида, а также его межвидовой передаче.

² По новой классификации, к *Ch. psittaci* относятся теперь только штаммы, которые вызывают заболевания птиц и могут, передаваясь человеку, вызывать заболевание пситтакозом.

³ Из-за облитатного внутриклеточного паразитизма возбудителей пситтакоза, орнитоза и венерической лимфогранулемы долго (вплоть до 1963 г.) считали крупными вирусами. Позже, обнаружив в составе их как ДНК, так и РНК, этих возбудителей отнесли к мелким бактериям. Содержание ДНК в хламидиях составляет 3-4 %, РНК – 2-7 %. Молекулярная масса ДНК составляет 660 МДа, а длина молекулы ДНК – 342,5 мкм (кольцевая молекула хламидийной ДНК содержит 6-8,5 млн пар нуклеотидов).

обусловлены наличием общих эпитопов (антигенных детерминант) у оболочечных (и даже внутренних) белков хламидий и некоторых других микроорганизмов. Общие гены или участки генов могут передаваться от одного вида бактерий к другому благодаря известному явлению трансформации или при переносе плазмидных ДНК (горизонтальная межвидовая передача информации). Таким образом, возникает антигенная мимикрия – уподобление отдельных структур достаточно далеких видов.

Серологический тест нельзя использовать для постановки окончательного диагноза. Необходимо принять во внимание клиническую картину и другие данные лабораторных исследований.

Характеристика показателей качества тест-системы “DIA-Chlamydia”

Чувствительность и специфичность тест-системы “DIA-Chlamydia” определяли на стандартных панелях охарактеризованных сыворонок, которые содержат и не содержат специфические антитела классов IgA и IgG против *Ch. trachomatis*. Панели производятся Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича Российской академии медицинских наук (Москва).

Стандартная панель сыворонок, содержащих и не содержащих специфические антитела класса IgA против *Ch. trachomatis*, состоит из 30 сыворонок:

- 18 отрицательных образцов (ОП/ГЗ < 1);
- 12 положительных образцов с разными уровнями противохламидийных антител

Стандартная панель сыворонок, содержащих и не содержащих специфические антитела класса IgG против *Ch. trachomatis*, состоит из 36 сыворонок:

- 20 отрицательных образцов (ОП/ГЗ < 1);
- 16 положительных образцов с разными уровнями противохламидийных антител. Результаты контроля тест-системы “DIA-Chlamydia” приведены в таблицах 3 и 4.

Интерпретация результатов определения IgG/IgA

Таблица 2. Интерпретация результатов ИФА

Наличие антител к <i>Ch. trachomatis</i>		Интерпретация результата
IgG	IgA	
Отрицательный	Отрицательный	Образец отрицательный или содержит слишком низкие уровни антител*
Отрицательный	Отрицательный или положительный	Возможна ранняя стадия инфекции*
Неопределенный или положительный	Отрицательный	Признак перенесенной инфекции
Положительный	Положительный	Острая или хроническая инфекция

*Следует отметить, что в случае ранней хламидийной инфекции результат ИФА может быть отрицательным из-за отсутствия антител в начальном периоде заболевания. При наличии клинических проявлений болезни рекомендуют провести повторное тестирование через 14-21 день. Четырехкратное повышение уровня антител говорит об обострении или развитии болезни.

Обычно антитела против хламидий находят у 55-65 % зараженных лиц. Их присутствие не всегда доказывает наличие болезни, а свидетельствует только о контакте организма с возбудителем. Кроме того, антитела можно обнаружить также у выздоровевших больных еще в течение года после болезни.

Иногда антител не находят из-за угнетения иммунного ответа организма и, следовательно, очень низкого уровня антител.

По данным разных исследователей, частота ложноположительных реакций на антихламидийные антитела составляет 2-5 % (Справочник СПб по медицинской лабораторной диагностике). Такие результаты могут быть

В зависимости от стадии развития хламидии существуют в разных морфологических формах. Главный компонент чистой популяции хламидий – элементарные тельца (ЭТ) сферической или овальной формы, диаметром 200-400 нм, окруженные двумя трехслойными мембранами. ЭТ состоит из двух компонентов – эксцентрически расположенного аналога ядра (нуклеоида) в форме овала или полумесяца, который прикасается к цитоплазматической мембране, и диффузно распределенного и менее плотно уложенного гранулированного материала – рибосом, расположенных рядом. ЭТ инфекционны, очень устойчивы к неблагоприятным влияниям в межклеточном пространстве. Они проникают в клетку путем фагоцитоза; в фагоцитарной вакуоли ЭТ превращаются в ретикулярные, или инициальные тельца (РТ, или ИТ), которые, размножаясь, образуют в цитоплазме тельца включения, названные тельцами Гальберштедтера-Провачека [5, 9]. Это вегетативная форма хламидий, которая становится предшественником нового поколения инфекционных ЭТ. Размеры РТ колеблются от 400-600 до 800-1.000 нм, форма их овальная или округлая; нередко ЭТ полиморфны. РТ покрыты четко выраженной трехслойной внешней оболочкой и внутренней мембраной. Их тонкая внутренняя структура состоит из более-менее плотной ретикулогрануляционной матрицы. В период накопления хламидий в пораженных тканях обнаруживают лабильный антиген токсического действия, связанный, главным образом, с ЭТ и напоминающий эндотоксин.

После нескольких циклов деления РТ через промежуточные формы превращаются в ЭТ нового поколения. Микроколонии паразита располагаются внутри цитоплазматических пузырьков (везикул), которые на определенной стадии заболевания разрушаются.

Таким образом, в ходе размножения хламидии проходят сложный биологический цикл трансформации от зрелых ЭТ через промежуточные РТ и их уплотненные формы вновь до ЭТ. Соединение двух фаз – внутриклеточного развития и выживания вне клетки – составляет жизненный цикл хламидий. Длительность одного цикла развития хламидий внутри клетки зависит от штамма и составляет 40-72 ч. Освобожденные из клеток ЭТ проникают в новые клетки хозяина, и там процесс

начинается сначала. При неблагоприятных условиях развития он может проходить медленнее и длиться дольше [5].

При бессимптомной инфекции ЭТ могут освободиться из клетки через узенький ободок цитоплазмы, а клетка сохраняет жизнеспособность.

Электронно-микроскопические исследования доказывают, что хламидии способны длительное время сохраняться в клетках эпителия и фибробластах, в клетках слизистой оболочки. ЭТ паразита поглощаются периферическими моноцитами, разносятся по всему организму. Оседая в тканях, моноциты превращаются в тканевые макрофаги и сохраняют жизнеспособность в течение нескольких месяцев. Как антигенные стимуляторы такие макрофаги способствуют образованию фиброзных гранулём в здоровой ткани. Выходя из клеток, хламидии или их обломки приводят к образованию антител в пораженном организме.

Антигенный состав хламидий

Хламидии, по данным электрофореза, содержат не менее чем 40 разных пептидов. Поэтому их антигенная структура сложна. Обнаружены разнообразные антигены паразита, которые имеют видовую, подвидовую, родовую и типовую специфичность [10].

Все хламидии имеют общий групповой, родоспецифичный антиген (липополисахаридный комплекс, реактивной половинной которого является 2-кето-3-дезоксиктановая кислота), используемый при диагностике заболеваний. ЛПС лежит на поверхности внешней мембраны паразита, при проведении реакции прямой или непрямой иммунофлюоресценции (РПИФ, РНИФ) видно ободок свечения. ЛПС хламидий впервые обнаружили при помощи реакции связывания компонента (РСК); этот антиген способен, кроме того, агглютинировать эритроциты мышей, хомяков и кур⁴ [6, 11-12].

⁴ ЛПС хламидий агглютинирует только эритроциты кур пород Леггорн и Белая подмосковная.

Результат каждого анализа оценивают по шкале:

> 10 DU	положительный
9 – 10 DU	неопределенный
< 9	отрицательный

Например, значения трёх лунок с отрицательным контролем:

$$C1 - 0,020; D1 - 0,022; E1 - 0,018$$

- $OP_{cp} K^* = 0,020$
- $ГЗ = OP_{cp} K^* + 0,12 = 0,020 + 0,12 = 0,14$

- Если исследуемая сыворотка имеет значение DU ниже 9, например, ОП образца равно 0,056 о.е., то формуле рассчитываем:

$0,056 \times 10 : 0,14 = 4$ DU; такая сыворотка считается отрицательной;

- Если исследуемая сыворотка имеет значение ОП, дающее значение DU в интервале от 9 до 10,

например ОП образца = 0,135 о.е.;

$0,135 \times 10 : 0,14 = 9,64$ DU, то такую сыворотку следует считать неопределенной или сомнительной. Эта сыворотка подлжет повторному анализу в двух лунках. Если она и вторично окажется сомнительной, следует повторно взять сыворотку у больного через 2-3 недели.

- Если исследуемая сыворотка имеет значение DU свыше 10 D,

например, ОП образца = 1,2 о.е.;

$1,2 \times 10 : 0,14 = 85,7$ DU, то такая сыворотка считается положительной.

Как исключение, ОП можно определять в обновленном режиме (450 нм относительно пустой лунки (бланка)). Необходимо в таком случае оставить пустую лунку при анализе. При работе в обновленном режиме падает чувствительность и точность анализа.

Учет результатов анализа

Наличие или отсутствие антител против *Ch. trachomatis* в исследованных образцах определяют при сравнении значений ОП каждой пробы с граничным значением (ГЗ).

- Рассчитывают среднее значение ОП для проб отрицательного контроля (ОП_{ср} К⁻) и для положительных контролей (ОГ_{ср} IgG К⁺ и ОГ_{ср} IgA К⁺).

Проведение анализа считают корректным, если ОГ_{ср} К⁻ не превышает 0,1 оптической единицы (о.е.), а средняя ОП положительных контролей не ниже 0,6 о.е.

Если одно из трёх значений ОП К⁻ превышает 0,1 о.е. или более чем вдвое превышает ОП_{ср} К⁻, его отбрасывают, а значение ОГ_{ср} К⁻ рассчитывают по остальным значениям ОП К⁻.

- Граничное значение (ГЗ) ОП. ГЗ рассчитывают, добавив константную величину **0,12** до значения ОП_{ср} К⁻.

Для определения количества антител в образце мы используем условными единицами

$$DU = \frac{\text{ОП сыворотки} \times 10}{\text{ГЗ}}$$

Основной белок внешней мембраны хламидий ОБВМ = ОБВО или МОМР (major outer membrane protein) на долю которого приходится около 60 % поверхностного белка, содержит видо- и серотипоспецифические эпитопы. Однако в нем имеются также области с высоким сходством среди видов (родоспецифические эпитопы), что обуславливает возможность появления перекрестных реакций. ММ у разных сероваров значительно отличается и составляет 38-45 кДа. ОБВМ стоек против воздействия высоких температур (выдерживает прогрев при 100 °С в течение 30 мин.), трипсина, папаина, нуклеаз; он растворим в эфире и ацетоне.

Видоспецифические антигены хламидий с ММ 150 кДа термолabileны и разрушаются прогреванием при температурах выше 60 °С, при обработке трипсином и фенолом. Такие структуры связаны с липидами и представляют собой липопротеины, расположенные в клеточной стенке хламидий. Эти антигены обнаруживаются в реакциях нейтритализации, гемагглютинации, преципитации, РСК [8].

Расхождения между штаммами хламидий обнаруживают в тесте защиты от токсичности на мышах [4, 6], когда антигена против определенного штамма обеспечивают или не обеспечивают защиты мышей от патогенного воздействия другого штамма. Использование микрометода иммунофлюоресценции позволило дифференцировать среди человеческих штаммов *Ch. trachomatis* 15 сероваров и один отдельный бивар, вызывающий пневмонию у мышей⁵ [6, 12].

Типоспецифические антигены хламидий – это полипептиды с ММ 27-32 кДа, присутствующие в препаратах ЭТ и РТ. Их можно обнаружить при помощи моноклональных антител (МКА) при иммуноэлектронной микроскопии.

⁵ Серовары А, В, В_a и С тождественны глазным штаммам *Ch. trachomatis*, выделенным в зонах, где обнаружены эндемичные очаги трахомы. К сероварам D, T, F, G, H, I и J принадлежат штаммы, выделенные их пораженных половых органов и прямой кишки, а также из легких и глаз больных с поражениями половых органов. Серовары L1, L2, L3 выделены от больных с клиническими признаками ВЛП. Серовар К иммунологически родственен с L3, но выделен от больных без клинических признаков ВЛП. Серовары *Ch. trachomatis* D, T, F, G, I, J и K – это основная причина хламидиозов, передающихся половым путем.

Типоспецифичность названных антигенов установили благодаря их способности связываться в иммуноблоте только с гомологичным антителом, которое выработалось против возбудителя определенного серологического варианта [1, 5-6, 12].

Типоспецифичным антигенам присуща высокая иммуногенность. Антитела, узнающие типоспецифические антигенные детерминанты – это единственные антитела, которые нейтрализуют инфекционную активность хламидий в культурах клеток.

Поверхностные антигены хламидий играют важную роль во многих жизненно важных функциях паразита (инфекционность, вирулентность, инвазивность, торможение лизосомной активности клеток хозяина, токсичность), которые могут быть подавлены антителами.

Хламидийные антигены вызывают обычно чрезвычайно слабый общий иммунный ответ. Большинство хламидиозов связано с поражением слизистых оболочек и местными (локальными) инфекциями, к которым относят все урогенитальные хламидийные инфекции (кроме ВЛГ). При таком характере заболеваний хламидийные антигены вызывают местную иммунную реакцию и, как правило, появление низких уровней гуморальных антител.

Из-за неясной симптоматики хламидийных заболеваний, а зачастую из-за полного отсутствия признаков недомогания особое значение при обнаружении этих патологий приобретают методы лабораторной диагностики [4-5, 8]. Благодаря хорошим результатам лечения хламидиозов при помощи антибиотиков совершенная диагностика этих заболеваний позволила бы обнаружить лиц, ставших бессимптомными носителями, надежно их излечить и предупредить распространение хламидийных заболеваний.

Методы лабораторной диагностики

Существующие методы диагностики хламидийной инфекции не обеспечивают ее полного обнаружения. Поэтому современная стратегия диагностики хламидий

- В лунки стрипов вносят по 20 мкл образцов исследуемых сывороток, оставив свободными 5 лунок первого ряда (лунки для контролей).

- В две лунки (A1, B1) вносят по 20 мкл положительного контроля IgG K⁺ или IgA K⁺, в зависимости от исследуемых антител, а в три других (C1- E1) – по 20 мкл отрицательного контроля (K). *При внесении контрольных и исследуемых образцов необходимо осторожно pipetировать смесь.* (Во время pipетирования цвет раствора в лунках изменяется.)

- Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при температуре 37 °C в течение 60 мин.

- По окончании инкубации удаляют содержимое лунок при помощи вошера или 8-канальной пипетки, после чего избавляются от лишней влаги (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).

- Готовят раствор конъюгата согласно п. 1.2. В зависимости от того, наличие антител какого класса требуется обнаружить в исследуемых образцах, используют конъюгат анти-IgG или анти-IgA.

- В лунки стрипов вносят по 100 мкл раствора конъюгата.

- Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при температуре 37 °C в течение 30 мин.

- По окончании инкубации удаляют содержимое лунок при помощи вошера или 8-канальной пипетки, после чего избавляются от лишней влаги (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).

- Готовят раствор проявителя согласно п. 1.3.

- Вносят в лунки стрипов по 100 мкл раствора проявителя.

- Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при 18-22 °C в темноте в течение 30 мин.

- Останавливают цветную реакцию, внося во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

- Не позже чем через 1 мин. после остановки цветной реакции определяют ОП лунках в двухволновом режиме (при 450 нм относительно 620 нм).

Раствор можно сохранять при температуре 2-8 °С не дольше 5-ти суток.

1.2 Приготовление раствора конъюгата

В чистый флакон отбирают 2 мл раствора № 4 для разведения конъюгата и добавляют 40 мкл конъюгата анти-IgG или анти-IgA, в зависимости от того, антитела какого класса должны исследоваться в образцах. Содержимое флакона тщательно перемешивают, не допуская образования пены.

Раствор готовят непосредственно перед использованием, он не подлежит хранению.

1.3 Приготовление раствора проявителя

В чистый флакон отбирают 1 мл хромогена ТМБ и добавляют 1 мл раствора № 5Г для приготовления проявителя; смесь интенсивно перемешивают.

Раствор проявителя следует оберегать от попадания света и от контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор проявителя должен быть бесцветным. Окрашивание раствора проявителя в течение нескольких минут после растворения свидетельствует о загрязнении посуды или раствора. Такой проявитель следует заменить.

Раствор готовят непосредственно перед использованием, он сохранению не подлежит.

2 Проведение анализа

• Перед проведением анализа вынимают из упаковки необходимое количество стрипов и вставляют их в рамку. Стрипы, не используемые в данной постановке, сохраняют в плотно закрытом пакете при температуре 2-8 °С в течение 1 месяца.

- Готовят раствор № 1 согласно п. 1.1.
- Вносят во все лунки по 350 мкл раствора № 1, выдерживают стрипы залитыми в течение 30-40 с и удаляют его при помощи вошера или 8-канальной пипетки, после чего извлекаются от лишней влаги (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).
- В каждую лунку стрипов вносят по 80 мкл раствора № 3 для разведения сыворток.

включает сочетание не менее двух методов – прямых и непрямых. Первые позволяют выявлять у пациентов непосредственно возбудитель заболевания, вторые основаны на определении специфических антител, образующихся в процессе иммунного ответа организма на внедрение возбудителя заболевания.

К прямым методам диагностики *Ch. trachomatis* относятся:

Цитологический метод.

Основу данного метода составляет выявление элементов включений, на основе использования различных методов окраски (по Гимзе или йодом). Чувствительность данного метода невелика. Существенным недостатком данного метода является субъективный учет реакции и низкая воспроизводимость результатов.

Культуральный метод

Диагностическое выделение возбудителя при помощи заражения куриных зародышей и культур чувствительных клеток (например, *Ch. trachomatis* хорошо растет в культуре клеток McCoy, а *Ch. pneumoniae* – в культуре перевиваемых клеток HEp-2) требует многих усилий, причем не всегда удается добиться роста хламидий (обычно через 3-7 дней). Этот метод существенно улучшен благодаря применению полиэтиленгликоля (ПЭГ) или 1 % раствора ДЭАЭ-декстрана, которые способствуют сохранению структуры возбудителя и помогают его проникновению в предварительно обработанные клетки. Дополнительные возможности обнаружить возбудителя дает также продление времени его выращивания [13]. Часто положительный результат можно получить при пересеве первично зараженных культур, в которых после первого пассажа не выявили цитопатогенного действия возбудителя и его структур из-за незначительного их количества (речь идет о так называемом методе слепых пассажей) [14]. Культуральный метод – это референтный метод при оценке эффективности антибактериального лечения, т.к. позволяет определить жизнеспособность микробной клетки [1]. Метод обладает высокой специфичностью, чувствительность его во многом зависит от правильности взятия и доставки биологического материала, качества питательных сред, квалификации

врачей-микробиологов и т.д. На практике для диагностики урогенитального хламидиоза к культуральному методу прибегают редко, так как он требует специально обустроенной лаборатории для работы с культурой клеток и высококвалифицированных специалистов. Поэтому культуральный метод используют в основном с научной целью.

Иммунологические методы.

Основаны на определении антигена хламидий в биологическом материале методами ИФА, иммунофлюоресценции и т.д.

До сих пор наиболее распространенным диагностическим подходом остается РПИФ (изучаются соскобы эпителия урогенитального тракта). Любой современный вариант иммунофлюоресцентного анализа ценен тем, что в случае положительного ответа в реакции он позволяет установить, с какой же именно структурой связан антиген, вызвавший положительный ответ, и действительно ли такой структурой является та или иная форма развития хламидий. В отличие от иных методов, РПИФ дает возможность сразу же исключить ложноположительный результат, так как в люминесцентном микроскопе видно, с какой именно структурой связан антиген, присоединивший антигента, меченные флюорохромом [2, 15].

Диагностические наборы, предназначенные для определения хламидийных антигенов в РПИФ на основе МКА (против ОБВМ или против родоспецифичного ЛПС), выпускают многочисленные зарубежные фирмы (Syva, Difco, Kallstad, Bartels, California Integrated Diagnostics). Чувствительность и специфичность РПИФ при использовании МКА составляют 65-90 % и 85-90 %, соответственно [5].

Для обнаружения растворимого антигена хламидий в исследуемых пробах используется также метод иммуноферментного анализа. Чаще всего в клинической практике применяют твердофазный ИФА, где твердая фаза (в основном полистироловый планшет) покрыта антихламидийными моноклональными антителами. Тест-системы (Imx Select Chlamydia, Abbott Laboratories; Chlamydia-Antigen ELISA, Medac Diagnostica) предназначены для обнаружения растворимых антигенов паразита [1, 6-7].

- избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность во время проведения анализа.

Требования к промыванию планшетов:

- некачественное промывание планшета приводит к некорректным результатам;
- для промывания планшета рекомендуют использовать автоматический промыватель (вошер); при отсутствии или плохой работе вошера лунки можно промывать при помощи 8-канальной пипетки;
- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение лунок и полное удаление жидкости из них: лунки должны заполняться доверху (350 мкл промывной жидкости на лунку), без переполнения лунок и перетекания жидкости из соседних лунок.

Подготовка образцов

Образцы сывороток сохраняют при температуре 2-8 °С в течение 72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже минус 20 °С) не более чем дважды. Образцы сывороток, содержащие агрегаты и осадок, необходимо осветлить при помощи центрифугирования.

Образцы, где заметны гемолиз, гиперлипидемия или бактериальное загрязнение (проросты), а также образцы, куда добавлен как консервант азид натрия, не годятся для анализа.

Подготовительные работы перед проведением анализа

1 Подготовка к анализу (из расчета на 16 лунок).

Выдерживают компоненты набора при температуре 18-22 °С в течение 30 мин.

Заполняют схему внесения и идентификации образцов.

1.1 Приготовление раствора №1 для промывания планшета

Содержимое одного флакона концентрата раствора № 1 интенсивно перемешивают. Отбирают 6 мл раствора и разводят в 270 мл дистиллированной воды, перемешивают. Если концентрат раствора содержит кристаллы, его прогревают перед использованием при 35-37 °С до полного растворения солей.

- - флаконы для реактивов (20 мл);
- - суховоздушный термостат на 37 °С;
- - аппарат для промывания планшетов (вошер);
- - фотометр для измерения оптической плотности в лунках планшета;
- - контейнер для сбора твердых отходов;
- - контейнер для слива отработанных загрязненных жидкостей.

Необходимые предосторожности

Меры безопасности при использовании набора:

- - работу проводить в специально оборудованном помещении;
- - работать в резиновых перчатках;
- - все использованные растворы обрабатывать 6 % -ным раствором перекиси водорода при комнатной температуре в течение 3 ч;
- - все твердые отходы собирать в специальный контейнер, стерилизовать его в автоклаве в течение 1 ч при температуре 120 °С;
- - инструменты, оборудование, а также рабочие поверхности протирать 70°-ным этиловым спиртом.
- - ЗАПРЕЩЕНО АВТОКЛАВИРОВАТЬ РАСТВОРЫ С ГИПОХЛОРИТОМ НАТРИЯ.

Правила работы с иммуноферментными тест-системами:

- не использовать набор после окончания срока годности, не смешивать компоненты наборов разных серий;
- тщательно перемешивать реагенты при подготовке и проведении анализа;
- использовать для приготовления реагентов чисто вымытую посуду, сполоснутую дистиллированной водой;
- не допускать подсыхания лунок на всех этапах постановки ИФА;
- проверять точность дозирования, следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования;

Полимеразная цепная реакция

Один из самых распространенных современных методов диагностики хламидиозов связан с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) [2, 5, 16-17] при работе с материалами, взятыми из урогенитального тракта и других очагов размножения хламидий (конъюнктивы глаза, слизистой оболочки прямой кишки и т.д.).⁶ Данная реакция сводится к многократно повторенным циклам синтеза (амплификации) специфической области ДНК-мишени в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы, дезоксирибонуклеотидфосфатов, соответствующего буфера и олигонуклеотидных заправоч-праймеров, которые определяют границы амплифицируемой последовательности. Основные мишени при обнаружении *Ch. trachomatis* – это нуклеотидные последовательности видоспецифичной криптической плазмиды, гена ОБВМ и рибосомных генов. Данный метод позволяет быстро (примерно за 5 ч) обнаружить нуклеотидные последовательности возбудителя в образцах. Этот высокочувствительный метод дает возможность установить латентное носительство инфекции. Недостатки упомянутого подхода – высокая стоимость наборов и оборудования, а также необходимость проведения работы высококвалифицированными специалистами.

Непрямые методы выявления *Ch. trachomatis* основаны на определении специфических антител, образующихся в процессе иммунного ответа организма на внедрение возбудителя заболевания. Эта группа методов позволяет, с одной стороны избежать ложноположительных результатов при прямых методах, а с другой – помогает в ряде случаев определить стадию и характер течения заболевания, что особенно важно при восходящей и персистирующей инфекции.

Эти методы имеют второстепенное значение в диагностике острой хламидийной инфекции из-за невысокого уровня антихламидийных антител. Но успешно используются при тяжелых воспалительных заболеваниях урогенитальной сферы для установления диагноза персистирующей, бессимптомной, вялотекущей инфекции или хронических

⁶ Нельзя забывать, что в сыроворотках взрослых людей обнаружить нуклеотидные последовательности хламидий невозможно.

последствий заболеваний, вызванных *Ch. trachomatis* (осложнений, возникающих в результате восходящей инфекции), когда другие методы лабораторной диагностики не эффективны и не позволяют выявить антигены или ДНК *Ch. trachomatis*, или живые микроорганизмы. Использование серологических методов исследования наиболее актуально при лабораторном обследовании больных с воспалительными заболеваниями органов малого таза. К этой группе методов относятся:

- реакция связывания комплимента – РСК,
- реакция непрямой иммунофлюоресценции – РНИФ,
- иммуноферментный анализ – ИФА.

Проведено немало сравнительных исследований, где определяли диагностическую ценность разных подходов для обнаружения хламидий или антител против них при помощи разнообразных коммерческих тест-систем (модификаций ИФА, ПЦР и т.д.). В настоящее время рекомендуют для проведения скрининговых исследований использовать ИФА, а для проверки результатов ИФА – РИФ или ПЦР. Если приходится работать в условиях скудного финансирования, то в популяциях с низкой частотой хламидиоза следует проводить исследования с помощью ИФА, чтобы проверить большое количество лиц: в этом случае будет истрачено меньше денег по сравнению с ПЦР, а доля ложноположительных результатов здесь сравнительно невелика. Амплификационные тесты, если их использовать для скрининга, оказываются в 2-3,7 раза дороже, чем ИФА. Поэтому исследователи выступают за амплификационные методы при работе с населением, для которого риск хламидийных заболеваний высок, а также при работе с подростками, пациентами из клиник венерических заболеваний, беременными и новорожденными [5].

За границей в течение последних лет как скрининговый метод широко используют ИФА [12, 18] с последующим подтверждением результата в РНИФ с применением МКА. Для диагностики у мужчин целесообразно брать осадок после центрифугирования образцов свежей мочи или/и определять наличие сывороточных антител против *Ch. trachomatis*. При этом результаты серологических анализов совпадают с данными культуральных исследований на 90 %, но при низких уровнях

Пример состава набора приводится в таблице 1.

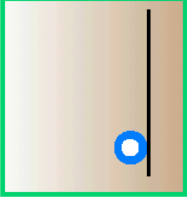
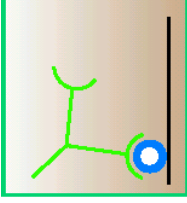
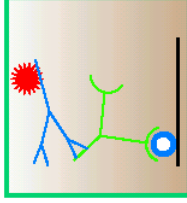
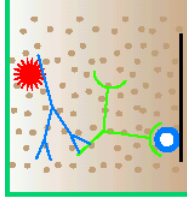
Таблица 1. В состав набора входят:

N	Название компонента	Количество
1	Концентрат раствора № 1 для промывания планшета	3 фл. по 25 мл
2	Иммуносорбент	2 планшета
3	Раствор № 3 для разведения сывороток	1 фл., 20 мл
4	Раствор № 4 для разведения конъюгата	1 фл., 26 мл
5	Концентрат раствора у № 5Г для приготовления проявителя	1 фл., 14 мл
6	Хромоген ТМБ	1 фл., 14 мл
7	Конъюгат иммуноферментный анти-IgG	1 ампл., 0,6 мл
8	Конъюгат иммуноферментный анти-IgA	1 ампл., 0,6 мл
9	Положительный контроль, содержащий антигена класса IgG против хламидий	1 ампл., 0,6 мл
10	Положительный контроль, содержащий антигена класса IgA против хламидий	1 ампл., 0,6 мл
11	Отрицательный контроль	1 ампл., 0,9 мл
12	Стоп-реагент	1 фл., 25 мл
13	Клейкая пленка	6 шт.

Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

- - вода дистиллированная;
- - перекись водорода, 6 %;
- - спирт этиловый, 70°;
- - вата гигроскопическая;
- - фильтровальная бумага;
- - пипетки одноканальные (5-40, 20-200, 200-1000 мкл) и наконечники к ним;
- - пипетки 8-канальные (50-300 мкл) и наконечники к ним;
- - мерный стакан или цилиндр (1000 мл);
- - ванночки для реагентов;

Схема проведения ИФА Этапы анализа

Процедура	Формирование Комплекса
Полистироловые стрипы, сенсibilизированы рекомбинантными белками.	
Внесение в лунки стрипов по 80 мкл раствора для разведения образцов и по 20 мкл образцов контролей и сывороток. Инкубация 60 мин. при 37 °С (формирование комплекса АГ-АГ). Промывание лунок буфером 4 раза.	
Внесение в лунки по 100 мкл раствора конъюгата. Инкубация 30 мин. при 37 °С (образование комплекса с конъюгатом). Промывание лунок буферным раствором 6 раз.	
Внесение в лунки по 100 мкл раствора перекиси водорода с хромогеном. Инкубация 30 мин. при комнатной температуре (окрашивание). Остановка реакции добавлением стоп-реагента. Регистрация оптической плотности.	

антител часто совпадения результатов сильно падает (вплоть до 60 % и ниже).

Специфические антитела при хламидийной инфекции

Совершенные серологические методы, с ИФА включительно, дают возможность не только диагностировать заболевание хламидиозом, но и определить стадию заболевания и характер его течения. Это особенно важно при развитии болезни в ее устойчивых формах, при хроническом ее течении, когда болезнь длится многие месяцы и годы, а паразиты постепенно разрушают ткани и органы. В основе таких подходов лежит определение специфических антител классов IgM, IgA и IgG, которые постепенно синтезируются и накапливаются в сыворотке крови и в секретах зараженного организма на разных этапах инфекционного процесса [2, 4, 12].

На первоначальном этапе иммунного ответа на хламидийную инфекцию в сыворотке крови появляются антитела класса IgM. В типичном случае их обычно находят через 5 дней после начала заболевания. Пик синтеза IgM приходится на первую-вторую неделю после начала заболевания, а через 2-3 месяца они исчезают из сыворотки даже при отсутствии лечения. Поскольку клинические признаки заболевания часто отсутствуют, то при запоздалом обращении к врачу антител класса IgM обычно не обнаруживают. IgM – это антитела острой фазы заболевания, и при повторном заражении они не образуются. Поэтому IgM при реинфекции не определяются, и они имеют ограниченное значение для диагностики.

IgA антитела существуют как в сывороточной так и в секреторной формах. Обнаружение антител класса IgA особенно важно для серодиагностики хламидийной инфекции по той причине, что данный класс антител – это показатель как острой, так и хронической формы заболевания. В сыворотке крови антитела класса IgA появляются через 10-14 дней после начала заболевания, немного раньше появления антител класса IgG, но в более низких концентрациях. Их можно обнаружить в начале болезни в семинальных и вагинальных выделениях. Высокие концентрации антител этого класса могут свидетельствовать о

хронической инфекции. Таким образом, в диагностике хламидийной инфекции очень важно определение IgA антител, так как IgA являются маркером как острой формы, так и манифестации при хронической форме инфекции. Специфические IgA имеют период полураспада 5-7 дней, что позволяет использовать их для контроля эффективности проводимого лечения: снижения титров элих антител в 2-3 раза говорит об успешном проведении терапии. Если уровень IgA после проведенного лечения не падает, это свидетельствует о возможном переходе инфекции в хроническую форму. Особенно важно обнаруживать IgA при проявлениях хронической формы инфекции и при рецидивах, когда специфические IgM не определяются, а IgG менее показательны из-за более длительного периода их существования.

У больных с бессимптомным течением болезни появление антител класса IgA с постоянными титрами в течение нескольких недель говорит о персистенции возбудителя и не может расцениваться как острая инфекция.

Антитела класса IgG появляются начиная с третьей недели после начала заболевания. Их наличие отражает общую картину позитивного иммунного ответа в случаях текущей, хронической или перенесенной инфекции. В последнем случае IgG могут определяться на низком уровне в течение многих лет. В случае рецидива или реактивации наблюдается заметное увеличение уровня IgG, который у нелеченных пациентов сохраняется на неизменном уровне. Высокие уровни антихламидийных IgG диагностически важны при хронических или системных инфекциях: сальпингиты, механическая infertility, перигепатиты, эпидимиты, синдром Рейтера и пневмонии. Для постановки окончательного диагноза следует одновременно определять специфические антитела классов IgA и IgG [12].

Серологические профили динамики антителообразования при острой и хронической рецдивующей хламидийной инфекции представлены на рис.1.

При внесении в лунки планшета образцов исследуемых сывороток антитела, специфичные к *Ch. trachomatis*, связываются с рекомбинантным антигеном на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело. Полученные комплексы обнаруживают при помощи специфических иммуноферментных конъюгатов анти-IgG или анти-IgA. После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляют раствор проявителя, который содержит субстрат пероксидазы (перекись водорода) и хромоген (3,3',5,5'-тетраметилбензидин – ТМБ). Пероксидазную реакцию останавливают, добавив стоп-реагент (0,5 М раствор серной кислоты), и измеряют оптическую плотность (ОП) смеси в лунках, которая при длине волны 450 нм пропорциональна концентрации специфических антител в пробах сывороток или плазмы крови.

Методика проведения ИФА на тест-системе "DIA-Chlamydia"

"DIA-Chlamydia" – тест-система иммуноферментная для обнаружения иммуноглобулинов класса IgG и/или класса IgA человека против *Chlamydia trachomatis*.

Назначение набора

Набор предназначен для анализа сыворотки или плазмы крови человека на наличие антител классов IgG и IgA против *Ch. trachomatis* методом иммуноферментного анализа.

Принцип анализа

Главные компоненты набора – иммуносорбент и иммуноферментные конъюгаты. Иммуносорбент – это полистироловый планшет, лунки которого сенсibilизированы видоспецифичным рекомбинантным антигеном *Ch. trachomatis*. Конъюгаты (анти-IgG и анти-IgA) – это МКА, конъюгированные с пероксидазой хрена (Рис.2).

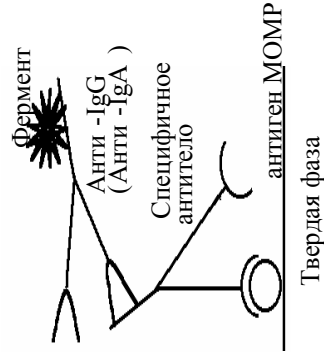
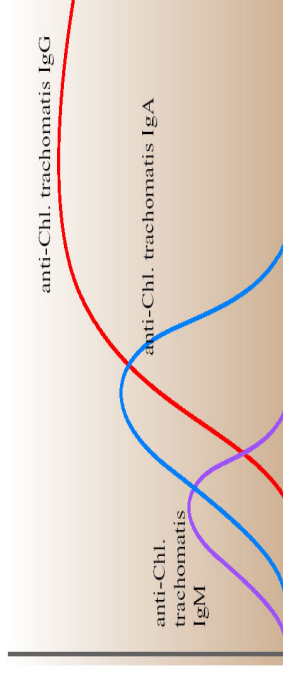


Рис.2

Серологический профиль при острой хламидийной инфекции



Серологический профиль при хронической хламидийной инфекции

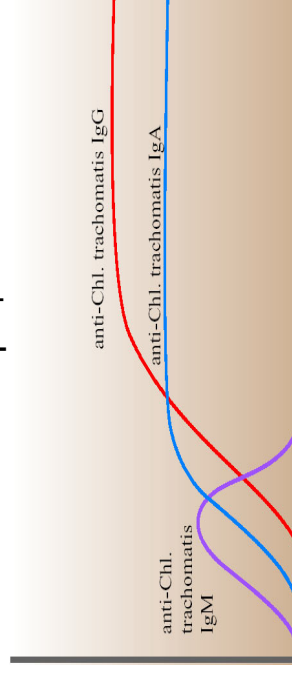


Рис. 1

Хроническое течение хламидийной инфекции позволяет диагностировать в крови пациентов IgA и IgG, уровни которых меняются незначительно в противоположность острой инфекции. Обнаружение невысоких постоянных уровней IgA антител в течение длительного периода времени может свидетельствовать о персистенции возбудителя при полном отсутствии симптоматики у пациентов. При лечении осложнений, вызванных восходящей хламидийной инфекцией,

определение уровня IgA и IgG может обеспечивать контроль излеченности пациентов.

Для того чтобы оценить динамику изменений уровня антител различных классов в клинике часто используют метод парных образцов. В соответствии с этим методом у одного и того же пациента проводят анализ специфических антител с интервалом в 2-3 недели. При этом необходимо проводить исследование парных образцов одним и тем же методом и с использованием наборов одного и того же производителя, либо исследовать парные сыворотки одновременно, при одной постановке анализа. На основании сравнения результатов при первом и втором обследовании делают заключение о характере и стадии заболевания. 2-4-кратная сероконверсия, т.е. увеличение титра антител во второй сыворотке по сравнению с первоначальной, свидетельствует об активной инфекции. Выявление 2-3-кратного снижения уровня IgA и/или IgG антител при исследовании в парных сыворотках может свидетельствовать об успешно проведенной терапии.

Важный показатель в серодиагностике – титр антител. Определение их титра (титрование) – это способ полуколичественного определения уровня специфических антител в сыворотке крови. Титр выражается в виде дроби, знаменатель которой указывает меру разведения исследуемой сыворотки, при котором анализ дает еще положительный результат. Обычно делают двукратные последовательные разведения (1:2, 1:4... 1:100, 1:200 и т.д.). Для каждого анализа существует критическая величина – тот минимальный титр, при котором результат анализа считается положительным. Чаще титры 1:50-1:100 относят к сомнительным, а титры превышающие 1:100, считаются положительными.

В ИФА анализ обычно ставят с одним разведением сыворотки, а величину титра определяют по формуле, учитывающей оптическую плотность образца. В современных тест-системах титры выражают в международных единицах (МЕ) или в нанogramмах на миллилитр (нг/мл), а в наборах компании „Диапроф-Мед” – в единицах DIA Units (DU), которые рассчитывают по Международному стандартному образцу, содержащему точно известное количество антител.

Обнаружить антитела против хламидий удается, по данным [2], у 65-70 % больных, количество же ложноположительных результатов может доходить до 2-5 %. Уровень антител зависит как от иммунореактивности организма, так и от скорости их удаления из организма. Поэтому постановка диагноза „хламидиоз” на основе отдельного положительного результата на наличие специфических антител невозможна. Наиболее корректный подход – использование данных об уровне противохламидийных антител для оценки течения болезни и осуществления лечения. Для этого исследуют парные сыворотки крови. Повышение титров антител в 4 раза и более говорит об обострении или развитии болезни. Понижение титров антител в ходе лечения свидетельствует о правильности лечения и хороших его результатах [5].

Ниже подана схема и методика проведения ИФА с использованием тест-системы "DIA-Chlamydia", выпускаемой научно-производственной компанией „Диапроф-Мед”, для обнаружения антител против *Ch. trachomatis*.