

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2014 * № 4

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Коллектив авторов, 2014

УДК 616.9

С.В. Ришчук¹, Л.Б. Важбин², Н.Р. Ахунова², А.А Полянская³

ПРЕЗЕНТАЦИЯ МЕТОДИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЙ ВОЗ ПО ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

² Московский областной клинический кожно-венерологический диспансер, Москва, Россия

³ Клиника «Премиум эстетикс», Москва, Россия

Проведен анализ главы 5 Рекомендаций ВОЗ 2013 года, касающейся диагностики урогенитальной хламидийной инфекции, в сопоставлении с последними отечественными рекомендациями, в которых имеет место недооценка серологических тестов и переоценка методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК).

Из Рекомендаций ВОЗ следует, что для успешной диагностики хламидийной инфекции необходимо применять одновременно два метода – МАНК и серологический тест, так как большинство пациентов обращаются при наличии осложнённой хламидийной инфекции, при которой МАНК могут давать ложноотрицательные результаты. Использование серологических тестов при восходящей хламидийной инфекции наиболее информативно в тех случаях, когда диагноз устанавливается впервые и отсутствует упоминание о лечении данной инфекции в анамнезе. Однако применение этих тест-систем должно быть крайне избирательным с учётом качества используемых антигена и конъюгата.

Ключевые слова: хламидийная инфекция, Рекомендации ВОЗ, диагностика осложнённой инфекции.

S.V. Rishchuk¹, L.B. Vazhbin², N.R. Akhunova², A.A. Polyanskaya³

PRESENTATION OF THE METHODOLOGICAL RECOMMENDATIONS OF THE WHO FOR CHLAMYDIAL INFECTION

¹ North-Western State Medical University I.I. Mechnikov, St.-Petersburg, Russia

² Research regional clinical STI center, Moscow, Russia

³ Clinic «Premium Aesthetics», Moscow, Russia

The analysis of Chapter 5 Recommendations the who 2013, regarding the diagnosis of urogenital chlamydia infection, in comparison with the latest national recommendations, which is an under-evaluation of serological tests and revaluation methods of nucleic acid amplification (NAAT).

The WHO Guidelines suggest that, for successful diagnosis of chlamydial infection it is necessary to apply simultaneously two methods - NAAT and serological test as most of the patients already in the presence of complicated chlamydial infection, which NAAT can give false negative results. The use of serological tests in ascending chlamydial infection is the most informative in cases where the diagnosis is established for the first time and there is no mention of the treatment of this infection in history. However, the application of these test systems must be extremely selective with regard to the quality of the antigen and conjugate.

Key words: chlamydia infection, the WHO Guidelines, diagnostic complicated infections.

Урогенитальный хламидиоз (УГХ) относится к одной из самых распространенных инфекций, передаваемых половым путем (ИППП). Регистрируемый уровень заболеваемости УГХ сильно зависит от особенностей клинических проявлений инфекции, качества ее лабораторной диагностики и наличия нормативных документов, регламентирующих использование существующих диагностических тестов. Вероятнее всего, в Российской Федерации отсутствуют реальные цифры заболеваемости. При этом имеет место их значительное занижение, предположительно, из-за ненадлежащего учёта случаев инфекции (особенно, в учреждениях коммерческой медицины), неадекватности лабораторной диагностики (в том числе по причине отсутствия соответствующих регламентирующих документов), невозможности проведения лабораторной диагностики хламидийной инфекции на должном уровне, а также низкого качества используемых отечественных тест-систем.

В последнее время предприняты попытки по созданию отечественных методических рекомендаций по оптимизации диагностики хламидийной инфекции [1, 11-13], в которых указано, что при их составлении за основу взяты рекомендации ВОЗ и Centers for Disease Control and Prevention последних лет [55]. Однако в большинстве из них при рассмотрении вопросов, касающихся лабораторной диагностики хламидиоза, абсолютизируется значение методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) как наиболее чувствительных и специфичных из прямых методов диагностики, и полностью исключается использование серологических тестов. При этом в соответствующих разделах высказываются категорические мнения, отличающиеся от изложенных в международных рекомендациях: серологическая диагностика «малопригодна для диагностики восходящей инфекции» и «...для дифференциальной диагностики причины бесплодия» [13]; серологический метод «недопустимо использовать для диагностики хламидийной инфекции» [1]; «серологическое исследование для диагностики отдельных случаев урогенитальной хламидийной инфекции не рекомендуется» [11, 12].

Наш многолетний клинический опыт показал, что при использовании в диагностике только МАНК нередко происходит недооценка хламидийной инфекции (особенно осложнённых её форм, которых подавляющее большинство), и отсутствуют какие-либо корреляции результатов данных лабораторных тестов с клинической проблематикой [5, 6, 10]. Вполне вероятно, что по этим причинам у многих бесплодных семейных пар хламидийная инфекция

(как этиологический фактор инфертильности) остаётся нераспознанной, устанавливается диагноз «идиопатическое бесплодие» и предпринимаются попытки применения вспомогательных репродуктивных технологий со всеми вытекающими последствиями в виде абортирования оплодотворённой яйцеклетки или осложнений (при удачной имплантации) у матери и плода [7, 9]. Настораживают также относительно низкие показатели частоты инфицирования хламидиями населения репродуктивного возраста России при их сопоставлении с уровнями поражённости аналогичного контингента в Европейских странах и США.

В связи с вышеизложенным представлялось целесообразным дать дословный лингвистический перевод Главы 5 «Хламидийная инфекция» Рекомендаций ВОЗ 2013 г. (авторы – Barbara Van Der Pol и Magnus Unemo) [55], в которой рассмотрены различные аспекты проблемы хламидийной инфекции, чтобы в заключение представить комментарии, касающиеся спорных вопросов диагностики урогенитальной хламидийной инфекции.

Глава 5. Хламидийная инфекция.

5.1. Введение. Хламидии (*Chlamydia trachomatis*) как этиологический агент вызывают значительную заболеваемость и экономические потери во всем мире. В 2008 году по оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) зарегистрировано 106 млн. новых случаев урогенитального хламидиоза среди взрослых в мире. Хламидии можно считать наиболее распространенной бактериальной инфекцией, передаваемой половым путем (ИППП), вместе с гонореей (также 106 млн. новых случаев).

C. trachomatis составляет три биовара, каждый из которых содержит несколько сероваров или генотипов (зависит от метода, используемого для классификации). Подразделение на биовары основано в зависимости от типа инфекции, локализации инфекции (тканевого тропизма) и вирулентности заболевания (табл. 1): биовары, вызывающие трахому (ведущая причина предотвратимой слепоты во всем мире и эндемичной трахомы во многих развивающихся странах), биовары, вызывающие генитальные инфекции (основная причина бактериальных ИППП в мире), и те, которые вызывают хламидийную лимфогранулему венереум (LGV; генитальные язвы заболевание, поражающее лимфоидную ткань).

Таблица 1. Инфекционные заболевания, ассоциированные с различными сероварами *C. trachomatis*

Серовар	Характеристики	Тропизм к тканям/ биовар	Инфекция
A-C (включая Ba)	Неинвазивный	Эпителиальные клетки/трахома	Эндемическая (ослепляющая) трахома
B-K (включая Da, Ia, Ja)	Неинвазивный	Эпителиальные клетки/трахома	Урогенитальная инфекция, конъюнктивит, пневмония новорожденных
L1, L2, L3	Инвазивная	Лимфатические клетки/ венерическая лимфогранулема	Венерическая лимфогранулема

Глазной biovar состоит из сероваров А-С, которые вызывают преимущественно конъюнктивальную инфекцию. Тканевой тропизм не является абсолютным, поскольку эти микроорганизмы, особенно серовар «В», также может быть изолирован из половых путей, хотя и с низкой частотой.

Преобладающий biovar состоит из сероваров D-K, которые передаются половым путем и инфицируют генитальный эпителий, вызывая уретрит у мужчин и цервицит (и уретрит) у женщин (табл. 2).

Таблица 2. Клинические проявления хламидийной инфекции

Генитальная инфекция	Первичная инфекция	Осложнения
Женщины	Цервицит, обильное гнойное отделяемое, рыхлая шейка матки, дизурия, тазовая боль, болезненность при пальпации шейки матки	Воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ), эктопическая беременность, сальпингит, бесплодие из-за трубного фактора
Мужчины	Выделения из уретры, дизурия, боль в яичках	Эпидидимит, простатит
Экстрагенитальные инфекции	Первичная инфекция	Осложнения
Прямая кишка	Выделения, боль в прямой кишке, кровь в стуле	Проктит
Ротоглотка	Фарингит, умеренная боль в горле	
Лимфатические узлы	Воспаление лимфоидной ткани	
Глаза	Конъюнктивит	
Пневмония новорожденных	Пневмония	Рубцевание, трахома (со слепотой)

Примечание: в исследованиях показано, что инфицирование *S. trachomatis* может облегчать передачу ВИЧ-инфекции; тем не менее, отношение шансов относительно низко.

Бессимптомное течение урогенитальной инфекции наблюдается у 50% мужчин и 90% женщин. Если их своевременно не определить и не лечить, то инфекция может подняться до верхнего генитального тракта и вызвать эпидидимит у мужчин и воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ) у женщин с соответствующими последствиями (внематочная беременность и трубный фактор бесплодия). Эти серовары могут быть изолированы при глазной инфекции у новорожденных, приобретенной в процессе прохождения через инфицированные родовые пути, хотя они вызывают трахому с низкой частотой. У новорожденных также может развиваться хламидийная пневмония из-за воздействия этих сероваров во время естественных родов (не путать с инфицированием *S. pneumoniae*).

Наконец LGV-biovar, состоящий из сероваров L1-L3, также передающийся половым путем, однако тропный к лимфоидным тканям и вызывающий более агрессивное течение заболевания. LGV-biovar более агрессивный и чаще, чем другие биовары, вызывает системный процесс. По LGV эндемичны многие развивающиеся страны по всему миру. Начиная с 2003 года, вспышки LGV проктита и проктосигмоидита были зарегистрированы среди мужчин-гомосексуалистов в Европе и Северной Америке, которые ранее наблюдались только как единичные случаи.

Таким образом, *S. trachomatis* вызывает наиболее распространенные бактериальные ИППП во всем мире и, в частности, спектр заболеваний в различных органах и систе-

мах (в том числе половых органах, глазах, лимфатических узлах и бронхах).

Негативные последствия, связанные с нелеченной инфекцией, вызванной *S. trachomatis*, включают PID, внематочную беременность, трубное бесплодие, воспаление придатков, простатит и другие.

5.2. Обзор доступных методов диагностики. Несмотря на широкую распространенность хламидийной инфекции, в связи с ограничениями диагностических методов сведения об этой ИППП до 1980-х годов были скудными. Ранее усилия были направлены в сторону совершенствования диагностики трахомы, а не ИППП. Серологические методы применялись для разграничения острой и хронической инфекции, но характеризовались недостаточной чувствительностью и специфичностью для диагностики острой инфекции и получения популяционных оценок подверженности инфицированию в течение жизни. Культуральный метод был стандартизован в 1970-х, однако необходимость сохранения жизнеспособности организма требовала соблюдения строгих условий транспортировки и хранения, что ограничивало его применение. Методы, основанные на выявлении антигенов – прямая иммунофлюоресценция (ПИФ) и твердофазный иммуноферментный анализ (enzyme-linked immunosorbent assays - ELISA) – были изобретены в начале 1980-х и значительно облегчили диагностику хламидийной инфекции. Затем, как дополнение к ELISA, появились несколько экспресс-тестов. ПИФ, ELISA и экспресс-тесты обладали субоптимальной специфичностью и недостаточной чувствительностью по сравнению с культуральным методом. Тем не менее, быстрота получения результата, менее строгие требования к транспортировке образцов и доступность сделали их привлекательными для врачей.

Следующим шагом в развитии диагностических методов стал поиск ДНК, а не антигена хламидий. Чувствительность первоначально применявшихся неамплификационных методов, основанных на гибридизации нуклеиновых кислот (*NAH - non-amplified nucleic acid hybridization assay*), соответствовала чувствительности культурального метода, но специфичность оставалась низкой. Добавление *Neisseria gonorrhoeae* к тестовой панели стало существенным преимуществом. Методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) стали следующим прорывом. МАНК основаны на ферментной амплификации ДНК или РНК возбудителя экспоненциально до миллиардов копий с последующей детекцией. Тип детекции характеризует уникальные характеристики каждого метода. Как в случае гибридизационных методов, МАНК дают возможность обнаружить в одном образце *S. trachomatis* и *N. gonorrhoeae*. Благодаря своим преимуществам, а именно большей чувствительности, специфичности, широкому спектру определяемых типов, автоматизации и отсутствию необходимости сохранять жизнеспособность организма, МАНК вошли в рекомендации по диагностике и скринингу хламидийной инфекции. Для получения дополнительной информации о различных методах диагностики хламидийной инфекции посетите сайт www.chlamydiae.com.

Воспроизводимость результатов [39, 46] требует проведения проверок и строгого контроля качества (КК) работы каждой лаборатории, причем не только при внедрении метода, но и далее на регулярной основе.

Для получения правильных результатов критически важно четко соблюдать рекомендации производителя относительно забора, транспортировки, хранения клинического материала и проведения специфического метода, включая контроль его качества.

5.3. Сбор, транспортировка и хранение образцов. Сбор, транспортировка и хранение образцов (табл. 3) зависят от применяемого метода диагностики. В данном разделе будут приведены некоторые общие рекомендации, но детали, характерные для специфических диагностических методов, указаны в соответствующих инструкциях по применению, вложенных в комплекты реактивов.

Таблица 3. Забор, транспортировка и хранение образцов

Локализация	Инструментарий для забора материала	Способ забора материала	МАНК	Культуральный метод	ПИФ	Экспресс-тесты
1	2	3	4	5	6	7
Шейка матки	Зонд или пластиковые кисточка\ щетка для жидкостной цитологии	С помощью дополнительного зонда удалите избыток слизи из шейки матки до забора материала. Щетка подходит только для МАНК. Поместите инструмент на 2-3 см в эндоцервикс и поверните на 360 ⁰ вдоль оси. Получение клеток из эндоцервикса критически важно для проведения ПИФ.	Поместите в пробирку, предоставленную фирмой-производителем или используйте жидкую цитологическую среду. Храните и транспортируйте согласно указаниям в инструкции.	Немедленно поместите в соответствующую транспортную среду (например, SPG буфер с антибактериальными добавками).	Сделайте тонкий мазок по предметному стеклу и высушите на воздухе	Поместите в буфер для экстракции из набора и далее следуйте указаниям в инструкции
Моча	Стерильный контейнер	Пациент не должен предварительно проводить интимную гигиену. Собирается первая утренняя порция мочи (обычно менее 25 мл)	Поместите в предоставленный производителем контейнер. Храните и транспортируйте согласно указаниям в инструкции.	Н\о	Н\о	Н\о
Влагалище	Зонд\ Пластик ^а	Материал может забирать как врач, так и сама пациентка. Поверните зонд так, чтобы он контактировал со стенками влагалища со всех сторон.	Поместите в предоставленный производителем контейнер. Храните и транспортируйте согласно указаниям в инструкции. Многие исследования поддерживают возможность «сухих мазков», хранящихся без транспортной среды.	Н\о	Н\о	Следуйте инструкции компании-производителя.

Продолжение таблицы 3						
1	2	3	4	5	6	7
Прямая кишка	Зонд\ пластик ^a	Поместите зонд на 2-3 см и поверните на 360 ⁰	<p>В настоящее время ни один производитель не имеет официальных рекомендаций по проведению данного типа исследований^d.</p> <p>Поступайте как с вагинальным мазком. Мазки можно транспортировать без среды, если тип исследования допускает это для мазков из эндцервикса.</p>	<p>Немедленно поместите в соответствующую транспортную среду (например, SPG буфер с антибактериальными добавками). Храните при 4⁰C для инокуляции в течение 24 часов или при 70⁰C - для длительного хранения.</p>	<p>Сделайте тонкий мазок по предметному стеклу и высушите на воздухе</p>	Н _o
Ротолотка	Мазок\ пластик ^a	Мазок с задней стенки глотки и крипт миндалин	<p>В настоящее время ни один производитель не имеет официальных рекомендаций по проведению данного типа исследований^d.</p> <p>Поступайте как с вагинальным мазком. Мазки можно транспортировать без среды, если тип исследования допускает это для мазков из эндцервикса.</p>	<p>Немедленно поместите в соответствующую транспортную среду (например, SPG буфер с антибактериальными добавками).</p>	<p>Сделайте тонкий мазок по предметному стеклу и высушите на воздухе</p>	Н _o

<i>Продолжение таблицы 3</i>						
1	2	3	4	5	6	7
Носоглотка (при подозрении на пневмонию новорожденных)	Зонд\ алюминий ^b	Мазок из носоглотки или трахеобронхиальный аспират	№	Немедленно поместите в соответствующую транспортную среду (например, SPG буфер с антибактериальными добавками). Храните при 4С для инокуляции в течение 24 часов или -70С для более длительного хранения.	Сделайте тонкий мазок по предметному стеклу и высушите на воздухе	№
Конъюнктивы	Зонд\ алюминий ^b	Мазок с поверхности конъюнктивы нижнего века	№	Немедленно поместите в соответствующую транспортную среду (например, SPG буфер с антибактериальными добавками). Храните при 4 ⁰ С для инокуляции в течение 24 часов или при 70 ⁰ С - для более длительного хранения.	Сделайте тонкий мазок по предметному стеклу и высушите на воздухе	№

ПИФ - прямая иммунофлуоресценция. НО - не определено. МАНК - методы амплификации нуклеиновых кислот. СФГ - сахарозо-фосфатно-глутаматный буфер.

A - дакроновый или вискозный тампон на пластиковом стержне.

B - дакроновый или вискозный тампон на алюминиевом стержне.

C - только некоторые экспресс-тесты лицензированы для анализа мазков из влагалища.

D - есть подтверждение, что соответствующие МАНК подходят для анализов данного типа, но ни у одного производителя нет рекомендаций по забору, транспортировке и хранению экстрагенитальных образцов.

Места забора материала различаются в зависимости от жалоб пациента и общей чувствительности методики. Для культурального метода, где требуются живые микроорганизмы, материал забирают с участков цилиндрического или кубовидного эпителия, в которых чаще протекает активная инфекция. У мужчин материалом служит эпителий уретры, а у женщин – эпителий шейки матки и, по показаниям, уретры. В клинических исследованиях показано частое выявление инфекционных агентов при заборе материала из эндоцервикса и уретры у женщин. Применение культурального метода у женщин повышает частоту выявления инфекции.

Материал из эндоцервикса получают, помещая инструмент для взятия мазка на 2-3 мм в шейку матки с поворотом на 360 градусов. Материал из эндоцервикса не забирают у девочек предпубертатного возраста, вместо этого обследуя преддверие влагалища и уретру. Материал из уретры получают, забирая мазки на глубине 2-3 см с покручиванием зонда с целью получения клеток в соскобе. Частой проблемой оказывается неправильный забор материала, что отрицательно сказывается на чувствительности культурального метода.

Хотя другие некультуральные и не основанные на МАНК методы не нуждаются в сохранении жизнеспособности организмов, их ограниченная чувствительность обуславливает необходимость забора достаточного количества микроорганизмов для получения положительных результатов. Кроме того, в случае методов, основанных на выявлении антигена, обычно требуются интактные микроорганизмы, следовательно, они обладают теми же ограничениями при заборе материала, что и культуральные методы. Некоторые варианты ELISA были одобрены для анализа образцов мужской мочи, так как в этом случае микроорганизмы смывались из уретры. Если получен необходимый объем первой порции мочи (в целом, менее 25 мл) и пациент не опорожнял мочевого пузыря за час до анализа, то число микроорганизмов в моче будет достаточными для детекции. Для женщин такой метод не подходит, так как инфицирование уретры у них происходит реже, а моча не содержит цервикального эпителия.

МАНК значительно информативнее, так как опираются на обнаружение нуклеиновых кислот, а не живых или интактных микроорганизмов. МАНК высокочувствительны и поэтому позволяют забирать материал менее инвазивным способом, подходят для анализа образцов, собранных самим пациентом (например, мазки из влагалища у женщин или моча у мужчин). МАНК также применимы для анализа остаточной среды для жидкостной цитологии, что дает возможность проводить скрининг у женщин после мазка по Папаниколау. Мазки из влагалища, собранные как врачом, так и самой пациенткой, одинаково хорошо подходят для анализа [29, 40]. Нужно поместить зонд во влагалище и повернуть его, чтобы собрать весь материал вагинальных стенок.

В некоторых случаях в зависимости от клинической картины и анамнеза необходимы экстрагенитальные образцы. Культуральный метод позволяет определить ректальную и орофарингеальную инфекцию, но его чувствительность низка из-за контаминационной микрофлоры. МАНК характеризуются большей чувствительностью, несмотря на то, что производителями не заявлено применение данных методов для подобных образцов. Применение МАНК для экстрагенитальных образцов, взятых у MSM (мужчин, имеющих секс с мужчинами), повышает выявляемость хламидийной инфекции [14, 16, 41, 48]. Клинический материал из прямой кишки может забрать как врач, так и

пациент, поместив тампон из дакрона на комфортную глубину (2-3 см) и повернув его на 360°. Из-за возрастающей чувствительности МАНК нет необходимости в визуализации прямой кишки для забора материала. Данный мазок следует производить всем, кто подвергся анальному половому акту. Самостоятельный забор материала для МАНК может повысить доступность скрининга и сократить временные затраты [22, 45]. Забор материала из ротоглотки – с задней поверхности глотки и крипт миндалин – производится при диагностике инфекций, передаваемых при оральном половом акте. У новорожденных с подозрением на заражение хламидийной пневмонией при родах производят забор материала из носоглотки. Данные образцы используются для культурального метода или ПИФ и, как правило, для других методов диагностики не подходят. Тем не менее, из-за низкой бактериальной нагрузки МАНК, вероятно, более эффективны; для подтверждения этого предположения нужно больше исследований в данной сфере. При заборе материала из носоглотки зонд вводится через ноздрю и должен коснуться стенки глотки. Конъюнктивальные мазки забирают, оттягивая нижнее веко и проводя зондом вдоль поверхности конъюнктивы нижнего века в сторону внутреннего угла глаза.

Для внедрения диагностического метода в практику необходимо одобрение Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA – Food and Drug Administration) США, включающее мультицентровые клинические исследования по сравнению данного метода с соответствующими стандартами. В таблице 4 суммированы стандарты проведения различных одобренных FDA диагностических тестов для выявления *C. trachomatis*.

Таблица 4. Апробированные для диагностики хламидийной инфекции диагностические методы (на июнь 2012 г.)

	МАНК	Культуральный метод	ПИФ	Экспресс-тесты
1	2	3	4	5
<i>Тип образца:</i>				
Мазок из шейки матки	Да	Да	Да	Да
Среда для жидкостной цитологии	Да (некоторые тесты)	Нет	Нет	Да (некоторые тесты)
Мазки из влагалища	Да (некоторые тесты)	Нет	Нет	Да (некоторые тесты)
Взятые самостоятельно	Да (некоторые тесты)	Нет	Нет	Да (некоторые тесты)
Собранные врачом	Да (некоторые тесты)	Нет	Нет	Да (некоторые тесты)
Моча:				
– женская	Да	Нет	Нет	Нет
– мужская	Да	Нет	Нет	Нет
Мазки из уретры у мужчин	Да	Да	Да	Да
Мазки из прямой кишки	Нет ^a	Да ^b	Да ^b	Да ^b
Мазки из ротоглотки	Нет ^a	Да ^b	Да ^b	Нет
Мазки из конъюнктивы	Нет ^a	Да	Да	Нет
<i>Проведение:</i>				
Чувствительность ^c	Очень высокая	Средняя или высокая	Низкая или средняя	Низкая или средняя
Специфичность	Очень высокая	Очень высокая	Средняя	Очень высокая

Продолжение таблицы 4				
1	2	3	4	5
<i>Другие факторы:</i>				
Цена	Очень высокая	Средняя	Низкая	Низкая
Транспортировка и хранение	При комнатной температуре до 60 дней (согласно листовке-вкладышу в упаковке)	24 часа при 4°C, далее при -70°C	Комнатная температура	Н\о
Инструментарий	Специализированная зона обслуживания	Стандартное микробиологические или вирусологическое	Флуоресцентный микроскоп	Незначительный или отсутствует
Производительность / автоматизация	Высокая / да	Низкая / нет	Низкая / нет	Низкая / нет
Уровень лабораторной инфраструктуры	Справочная	Справочная	Центральная	Местная
Возможность определять множество патогенов в одном образце	На некоторых платформах – <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> и ВПЧ	Нет	Нет	Нет
Другие комментарии	Из-за своих преимуществ МАНК рекомендованы для диагностики и скрининга. Риск контаминации лаборатории требует тщательного следования протоколу. В некоторых случаях для запусках реакции требуются большие размеры партий, что может удлинять время получения результатов.	Строгие требования к сбору и транспортировке образцов для поддержания жизнеспособности микроорганизмов – главный барьер по чувствительности для данного метода. Возможность получения живых изолятов полезна для дополнительных тестирований, таких как генотипирование и проверка на чувствительность к антибиотикам.	Рекомендовано для быстрого выявления инфицирования конъюнктив.	Выявленная инфекция может быть пролечена до того, как пациент покинет клинику.

ПИФ, прямая иммунофлуоресценция; Н\о, не определено; МАНК, методы амплификации нуклеи-

новых кислот; *изучено Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) США;

^a данные указывают, что соответствующие МАНК подходят для анализов данного типа, но ни у одного производителя нет рекомендаций по забору, транспортировке и хранению экстрагенитальных образцов;

^b по сравнению с современными МАНК для данного типа образцов чувствительность культурального метода и ПИФ ниже;

^c данные оценки чувствительности варьируют как в зависимости от самого анализируемого метода, так и от «золотого стандарта». МАНК превосходят все прочие диагностические методы по чувствительности и обладают высокой специфичностью.

Источник: адаптировано из Unemo M, Papp JR. Infections caused by *Chlamydia trachomatis*. In: Morse S.A. et al., eds. Atlas of sexually transmitted diseases and AIDS, 4th ed. Edinburgh, Saunders/Elsevier, 2010: 40–63.

Таким образом, забор, транспортировка и хранение образцов зависят от метода исследования и могут оказывать значительное влияние на его чувствительность. Правильный забор материала и выбор метода детекции крайне важен для эффективной диагностики.

5.4. Методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК).

Молекулярное определение специфических последовательностей нуклеиновых кислот и последующая валидация и коммерциализация подобных методов значительно улучшили выявляемость *C. trachomatis*. Первыми были изобретены неамплификационные методы, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот, такие как Gen-Probe PACE2 и PACE 2C (компания Gen-Probe, США), которые заключались в связывании специфических комплементарных зондов из нуклеиновых кислот и последующей сигнальной амплификации, выявляющей это связывание. Данные тесты примерно на 10–15% менее чувствительны, чем МАНК, и поэтому не должны применяться при доступности МАНК. МАНК проводятся значительно легче, чем любые другие тесты для детекции хламидийной инфекции [19, 26, 31, 53] и поэтому рекомендованы Центром США по контролю и профилактике заболеваний и другими регулирующими организациями как для диагностики, так и для скрининга на хламидийную инфекцию при заборе материала с генитальных и экстрагенитальных зон [15]. Подтверждающее тестирование *C. trachomatis*-положительных образцов уже не рекомендуется.

Валидированные и эффективные МАНК имеют некоторые преимущества вне зависимости от компании производителя. Они являются наиболее чувствительными из доступных методов диагностики, что также дает возможность складировать образцы при ограниченных ресурсах; нет необходимости поддерживать жизнеспособность микроорганизма; большинство коммерчески доступных тест-систем позволяют проводить тестирование на хламидий и гонорею; с помощью МАНК можно анализировать в том числе и менее инвазивный клинический материал (мочу и мазки из влагалища) в дополнение к ранее необходимым эндоцервикальным и уретральным мазкам. Кроме того, МАНК хорошо подходят для автоматизации, облегчают стандартизацию и контроль качества экстракции и детекции, а также значительно увеличивает производительность. Тем не менее, МАНК разделяют ряд распространенных недостатков. Технологии амплификации требуют соответствующего оборудования, которое не могут позволить себе страны с ограниченными ресурсами. Данные методы подвержены контаминации из-за экспоненциальной амплификации последовательностей-мишеней. Любое действие с участием открытого образца – потенциальный источник формирования аэрозоля и контаминации окружающей среды. Если лабораторное оборудование, боксы и пипетаторы контаминируются, проводить деконтаминацию крайне непросто.

Другой вопрос касается риска ложноотрицательных результатов. Процесс экстракции нуклеиновых кислот критически важен, но его качество сложно гарантировать для каждого образца. Для эффективной амплификации необходима точная концентрация

соли, нуклеотидов и ферментов, что требует высокой точности при пипетировании. Фермент, который ускоряет амплификацию, так же может быть чувствительным к компонентам крови, слизи и мочи. Поэтому отрицательные результаты могут на самом деле отражать недостаток нуклеиновых кислот мишени из-за неправильного сбора материала или экстракции, либо некачественную амплификацию, а не отсутствие ДНК-мишени. Доля образцов, в которых амплификация ингибирована, варьирует в зависимости от метода тестирования и при некоторых случаях может достигать 7,5% [37]. Тем не менее, проведение данных тестов по-прежнему предпочтительнее, чем использование культурального метода, который может давать ложноотрицательные результаты из-за гибели микроорганизма, и некультуральных методов, обладающих меньшей или сходной чувствительностью по сравнению с культуральным методом, но по-прежнему обладая субоптимальной специфичностью. Поэтому, несмотря на необходимость соблюдения строгих лабораторных условий, преимущества МАНК значительно превосходят их недостатки. Применение МАНК предпочтительно даже в условиях ограниченных средств, что решается путем создания региональных справочных лабораторий. Региональные справочные лаборатории дают множество преимуществ: больший объем тестирования, четкое соблюдение стандартов работы и осуществление качественной технической экспертизы. Использование региональных лабораторий может снизить затраты при использовании самых чувствительных методов тестирования. Несмотря на необходимость пересылания образцов, высокий объем тестирования и доступ к высокопроизводительному автоматизированному оборудованию дает аналогичное или сокращенное время оборота. По этим причинам лабораториям, которые не могут обеспечить проведение наиболее чувствительных МАНК, следует начать сотрудничать с региональными справочными лабораториями, а не применять менее чувствительные диагностические методы.

В настоящее время одобренные FDA коммерческие тест-системы для обнаружения *S. trachomatis* производятся четырьмя компаниями. Все одобренные тест-системы определяют венерическую лимфогранулему как *S. trachomatis*-позитивную, но без указания результата как положительного именно по венерической лимфогранулеме. Для этого следует проводить генотипирование. Важно отметить, что существует множество других коммерческих тест-систем на основе МАНК для диагностики *S. trachomatis* [43, 51]. Если используется не одобренная FDA тест-система, региональные и другие национальные регуляторные организации должны проконтролировать ее качество и порядок проведения анализа. Строго рекомендовано использование международно одобренных тест-систем. По возможности, следует сравнивать эффективность и качество предлагаемых тест-систем с международно одобренными до начала их применения и далее проводить диагностику с использованием соответствующего положительного, отрицательного контроля и контроля ингибирования; также строго рекомендовано участие в работе соответствующих внешних систем контроля качества.

Таким образом, молекулярные методы характеризуются максимальной чувствительностью и высокой специфичностью. Молекулярные методы не нуждаются в соблюдении строгих условий транспортировки и хранения, лишены субъективности (которая есть у микроскопического анализа). Если международно одобренные МАНК недоступны, строго рекомендовано предварительно провести контроль качества предлагаемого МАНК для местного применения, сравнив его по крайней мере с одним международно одобренным МАНК. Скоро станут доступны новые методы исследования. Следует изучать профессиональную литературу и постоянно отслеживать качество новых методов диагностики, выбирая лучшие.

5.4.1. Молекулярные тесты Abbott. Тесты Abbott RealTime CT/NG и CT проводятся автоматически на системе m2000 (Abbott Molecular, США). Данный тип исследований заменил одобренные FDA LCx тесты, которые были одними из первых коммерчески доступных МАНК. ПЦР в режиме реального времени использует m2000sp – инструмент для автоматизированной пробоподготовки, который производит экстракцию ДНК с по-

мощью захватного устройства на магнитных частицах. После экстракции m2000sp загружает мастер-микс в плашку для ПЦР и добавляет очищенные образцы, готовые для амплификации в режиме реального времени и последующей детекции в m2000rt [38]. Данный термоциклер проводит детекцию амплификации с помощью флуоресцентной эмиссии, которая происходит когда зонды специфически связываются с амплифицированными последовательностями-мишенями в каждом амплификационном цикле. Тесты теперь включают две мишени, т.е. две последовательности ДНК криптоической плазмиды (7-10 копий на микроорганизм) с целью обнаружения нового, «шведского варианта» *S. trachomatis*, который послужил причиной тысяч ложноотрицательных ответов в Швеции и некоторых других странах северной Европы, применявших на тот момент тест-системы от Roche и Abbott [44, 50, 52]. Система может детектировать множественные сигналы, что позволяет выявлять в каждом образце хламидийную инфекцию, гонорею и неконкурентный внутренний контроль для измерения потенциального ингибирования реакции. Последовательность внутреннего контроля основана на растительной ДНК, которая добавляется в ходе экстракции ДНК для измерения ее точности и исключения потенциального ингибирования ПЦР. Это единственный способ подтвердить, что выделение ДНК прошло успешно. Система позволяет анализировать по 96 образцов за цикл, включая 3 контроля, что дает возможность протестировать 186 образцов и 6 контролей примерно за 8 часов.

В качестве клинического материала можно использовать мочу, вагинальные, эндцервикальные и уретральные мазки. Мазки и образцы мочи собирают с помощью набора, поставляемого производителем, далее они могут храниться при температуре 2-30°C в течение 14 дней до тестирования. Данный набор един для всех типов образцов, которые могут одновременно анализироваться на m2000. Возможность длительно хранить клинический материал при комнатной температуре делает данный метод привлекательным для государственных медицинских учреждений, которые затем отсылают образцы в справочные лаборатории.

ПЦР в режиме реального времени *Real time* CT\NG имеет высокую аналитическую чувствительность и сравним с АРТИМА Combo 2 тестом [24]. Процесс очищения ДНК необходим для удаления потенциальных ингибиторов и естественных флуорофоров, а внутренний контроль позволяет исключить ингибирование реакции. Применение технологии гомогенной флуоресцентной детекции со специфическими ПЦР праймерами сочетается с амплификацией и детекцией в одноэтапной закрытой системе. Герметичность системы снижает риск перекрестной контаминации, а использование отрицательного контроля позволяет быстро выявить внешнюю контаминацию.

5.4.2. Тест-система Becton и Dickinson (BD). BD ProbeTec ET для определения хламидий и гонококков (производство Becton, Dickinson and Company, США) была первой коммерчески доступной и одобренной FDA тест-системой, работавшей в режиме реального времени. В данном тесте проводится изотермическая амплификация с замещением цепей (SDA) для одновременной амплификации и детекции последовательностей-мишеней при 52,5°C. Амплификация последовательности хламидийных криптоических плазмид происходит в герметичной плашке со считыванием сигнала за счет передачи энергии флуоресценции. Данная схема позволяет минимизировать риск внешней перекрестной контаминации, так как амплифицируемые образцы остаются закрытыми.

ProbeTec позволяет анализировать мочу, мазки из шейки матки и уретры. Также подтверждена информативность вагинальных мазков, проводятся исследования по проведению данного анализа для образцов других локализаций. Мазки забирают с помощью специального набора, они могут храниться при комнатной температуре до 6 дней. Первая утренняя порция мочи может храниться 24 часа при 4°C. При добавлении консерванта сроки хранения мочи возрастают (до 2 дней при комнатной температуре и 4-6 дней при 4°C).

Данный метод позволяет выявлять *S. trachomatis* и *N. gonorrhoeae* и имеет дополнительный внешний контроль амплификации [53]. Выбор тестов стрип-специфический для хламидий и гонококков (т.е. каждый стип из 8 образцов должен быть протестирован

на одну и ту же комбинацию микроорганизмов).

Тем не менее, применение контроля амплификации плашко-зависимое, т.е. если выбран определенный тип анализа, он применяется ко всем образцам в плашке. Тест в 96-луночном формате позволит отделить лунки для каждой последовательности-мишени. Поэтому, если нужно выявить хламидии, гонококки и контроль амплификации, используются лунки каждой из 3 колонок и в одной плашке анализируются 32 образца с контролями. Если же требуется выявить только хламидии, в одной плашке можно проанализировать 96 образцов.

Так как анализ проводится в закрытом виде, ферментативные методы снижения перекрестной контаминации от предшествующих амплификаций не используются. Но, к сожалению, отмечается возрастание числа случаев внешней контаминации. В таких случаях нужны недели для очищения помещения и возобновления работы, что приводит к дорогостоящим задержкам и нередко требует перестановки оборудования в зоны, не подверженные контаминации. Лаборатории, использующие данный метод, должны регулярно отслеживать внешнюю контаминацию. Исследования второго поколения, более устойчивые к данному типу контаминации, еще на стадии разработки.

BD также изобрели новое поколение тестов – одобренный FDA ProbeTec ET CTQx/GCQX на Viper System с XTR (Viper). Данный тест также полностью автоматизирован и может выдавать 278 результатов за один 8-часовой рабочий цикл. В данном тесте используется двойной набор реактивов, который позволяет проводить детекцию амплификации в сочетании с детекцией каждого образца хламидий или гонококков. Система очень функциональная и высокопроизводительна [23].

5.4.3. Диагностическая тест-система Gen-probe. FDA одобрило тест-систему AP-TIMA Combo 2 (компания Gen-Probe, США), основанную на принципе захвата рРНК мишени (с целью снижения или устранения ингибирования амплификации), т.е. выделении последовательностей-мишеней рРНК с помощью захвата олигонуклеотидов и ДНК магнитными гранулами с последующей транскрипционно-опосредованной амплификацией последовательностей 23S рРНК *C. trachomatis*. Амплификацию отслеживают с помощью кинетики испускания света от меченных ДНК-зондов, комплементарных области мишени. Отсутствие ингибирования подтверждают, используя полученные от пациентов отрицательные образцы, меченные лабораторными штаммами *C. trachomatis* [21].

Для анализа подходят моча, эпителий влагалища, шейки матки и уретры, а также среда для жидкостной цитологии [20, 26]. Мазки помещают в предлагаемую производителем транспортную среду, в которой они могут храниться до 60 дней при комнатной температуре, что значительно облегчает транспорт в отдаленные лаборатории. Первая утренняя моча стабильна в течение 24 часов после сбора и после помещения в транспортную среду может храниться до 30 дней. АРТИМА Combo тест также позволяет определять *N. gonorrhoeae* (16S рРНК). В целом, за 8-часовой цикл в автоматизированной системе (TIGRIS) могут быть проанализированы около 500 образцов. Популярность данного метода диагностики быстро растет во многих странах из-за крайне высокой чувствительности, специфичности, длительного хранения клинического материала и автоматизации процесса.

Так как образцы после амплификации остаются опечатанными, риск перекрестной внешней контаминации должен быть крайне низок. Тем не менее, строго рекомендован контроль чистоты внешней среды ввиду отсутствия ферментного и других методов измерения деградации продуктов амплификации. Производитель настоятельно рекомендует проводить процедуры деконтаминации. Должна отслеживаться воспроизводимость результатов. Более того, для идеальной специфичности доступны подтверждающие исследования, определяющие специфическую 16S рРНК *C. trachomatis* (АРТИМА СТ) и специфическую 16S рРНК *N. gonorrhoeae* (АРТИМА GC; используется другая последовательность 16S рРНК по сравнению с той, что входит в АРТИМА Combo 2), данные тесты идеальны для подтверждения положительных результатов при повторных тестированиях [20].

5.4.4. Диагностическая тест-система Roche. Одобренная FDA тест-система Cobas

Amplicor CT/NG (Roche Diagnostics, США) заключается в применении ПЦР для амплификации ДНК-последовательности мишени с использованием организмо-специфической биотинилированной пары праймеров. Мишенью служит фрагмент криптической плазмиды хламидий. После трехтемпературного процесса амплификации продукт оказывается гибридован с магнитными гранулами, покрытыми видоспецифическими зондами, которые расположены перед последовательностью праймера. Процесс детекции основан на взаимодействии биотина и авидина. Один прибор Cobas способен проанализировать до 96 проб, включая образцы и контроли, за 8 часов. Клинический материал помещают в поставляемую производителем транспортную среду. Моча и мазки могут храниться при 4°C до 7 дней. Для исследования подходят мазки из шейки матки и уретры, среда для жидкостной цитологии и первая порция утренней мочи, хотя женская моча не должна использоваться для исследования на гонорею. Мазки из влагалища также достаточно информативны для анализа на данной платформе [25,47].

Тест-система включает контроль ингибирования на основе неуместной последовательности ДНК, заранее помещенной в каждую реакционную пробирку. Это позволяет подтвердить, что отрицательный результат действительно отрицателен. В исследовании в амплификационной смеси также используется фермент (урацил-N-гликозилаза), который разрушает ранее амплифицированные последовательности на основании наличия дУТФ (диоксиурациотрифосфата), а не дТТФ (диокситимидинтрифосфата) в продукте амплификации. Это обеспечивает защиту от микробрызг и аэролизации, которая обычно происходит при работе с большим количеством образцов, а значит, увеличивает воспроизводимость результатов.

Cobas TaqMan CT v2.0, с CE меткой в Европе – тест-система второго поколения от компании Roche. В данной платформе используется ПЦР в режиме реального времени, которая может проводиться на автоматизированном анализаторе, чтобы минимизировать ручной труд лаборантов. Тест-система может применяться для диагностики только хламидийной инфекции без сопутствующего тестирования на гонорею. Последнее поколение тест-системы от Roche (Cobas 4800 CT/NG), которое также позволяет детектировать *N. gonorrhoeae*, теперь одобрено FDA. Оно представляет собой ПЦР в режиме реального времени на полностью автоматизированной платформе. Используемые в Cobas TaqMan CT v2.0 и Cobas 4800 CT/NG праймеры-мишени были перестроены и теперь позволяют обнаруживать два участка генома хламидий, а значит, выявлять и шведский штамм [44, 50, 52]. Вторая мишень не локализуется на плазмиде, а расположена на обратной стороне гена *ompA*, кодирующего главный белок наружной мембраны (МOMP). Порядок проведения теста совпадает с таковым у других МАНК. Данная тест-система обеспечивает контроль амплификации и профилактику перекрестной контаминации в сочетании с автоматизацией, позволяющей анализировать до 278 образцов в течение 8-часового цикла. Она хорошо работает с инвазивными мазками, а также вагинальными мазками у женщин и мочой у мужчин. На стадии исследования ее эффективность для анализа среды для жидкостной цитологии.

5.4.5. Другие МАНК. Перечисленные тест-системы описаны на основе информации, доступной к моменту написания данного материала. Некоторые новые МАНК находятся на стадии разработки и апробирования и в дальнейшем смогут расширить диагностические возможности. Лаборатории должны быть в курсе всех обновлений и регулярно отслеживать появление новых методик. Кроме того, нередко одобренные FDA методы исследования недоступны из-за дороговизны или потребности в специализированном оборудовании. В таких случаях используются не рассмотренные FDA, но коммерчески доступные, либо новые, изобретенные в лабораториях методы, обладающие большей чувствительностью по сравнению с другими методами детекции (например, ПИФ или ELISA). Если используется МАНК, не одобренный FDA, региональные и/или другие национальные регуляторные органы должны обеспечить безопасность и качество проведения диагностических МАНК [43, 51]. Также важно, чтобы лаборатории подвергли данные МАНК

строгой валидации до их применения на клиническом материале от пациентов (см. также главу 2 и приложение 3 относительно МАНК, их валидации и контроля качества).

5.5. Методы детекции, не основанные на выявлении нуклеиновых кислот.

5.5.1. Прямая иммунофлуоресценция (ПИФ). В ПИФ используются флуоресцентно меченные моноклональные антитела для микроскопической визуализации элементарных телец *C. trachomatis* в клеточных мазках, собранных с конъюнктивы, уретры и эндоцервикса. Это единственный тип тестирования, позволяющий напрямую оценивать качество образца; тем не менее, ПИФ обладает субоптимальной чувствительностью даже относительно культурального метода.

Две тест-системы для ПИФ - MicroTrak (Trinity Biotech, Ирландия) и Pathfinder (BioRad Laboratories, США) - применяются для окрашивания мазков из уретры, шейки матки, прямой кишки, ротоглотки и конъюнктивы для визуализации элементарных телец хламидий. В исследовании MicroTrak используются флуоресцентно меченные моноклональные антитела к МOMP *C. trachomatis*, которые не дают перекрестной реакции с *C. pneumoniae*.

Напротив, реагенты Pathfinder используют поликлональные антитела к липополисахариду (LPS) *C. trachomatis*, которые могут вступать в перекрестную реакцию с *C. pneumoniae*. Чаще всего ПИФ применяется для анализа мазков с конъюнктивы у новорожденных в развитых странах. ПИФ позволяет быстро получать результаты, обладает высокой специфичностью и подходит для выявления нежизнеспособных микроорганизмов. В дополнение, ни одно другое коммерчески доступное исследование не имеет одобрения для анализа мазков с конъюнктивы и не позволяет напрямую оценить качество образцов. Тем не менее, ПИФ менее чувствительна, чем МАНК, трудоемка, имеет низкую пропускную способность и осуществляется только квалифицированным персоналом. Есть риск получения ложноотрицательных результатов из-за некачественного проведения анализа.

5.5.2. Экспресс-диагностика. ELISA характеризуется низкой чувствительностью и субоптимальной специфичностью (особенно ELISA, определяющая LPS) по сравнению с МАНК, что требует повторного анализа для подтверждения положительных результатов. Также есть риск ложноотрицательных результатов при некачественном проведении анализа. Из-за этих ограничений ELISA не применяется при наличии более современных методов исследования.

Тем не менее, в отличие от ELISA, экспресс-тесты, использующие технологию ELISA, имеют преимущества, оправдывающие их применение в некоторых ситуациях. Для диагностики хламидийной инфекции были разработаны некоторые экспресс-тесты, основанные на ИФА на тест-полосках. Многие из них были внимательно изучены и коммерциализированы, но большинство не было подвергнуто всесторонней оценке. Тем не менее, по сравнению с МАНК, данный быстрый тест явно обладает недостаточной чувствительностью и может применяться только в случае ограниченных диагностических возможностей. В приложении 2 обсуждены принципы, применяемые в экспресс-тестах. Несмотря на свою низкую чувствительность, в условиях с ограниченными ресурсами и высокой распространенностью инфекции экспресс-тесты дают возможность проводить диагностику и лечить пациента на месте [32].

В исследовании с анализом решения, проведенном Gift et al. [28], при частоте возвращения пациентов к лечению в 65% и ниже экспресс-диагностика обеспечивала рост числа пролеченных пациентов даже при обнаружении меньшего числа инфекций. В данных условиях экспресс-тесты также могут применяться для увеличения специфичности алгоритмов синдромной терапии, что позволит снизить дозы назначаемых препаратов и провести скрининг на бессимптомно протекающие инфекции.

Экспресс-тесты расширяют возможности амбулаторной диагностики и позволяют немедленно назначить лечение. В некоторых случаях эти преимущества превосходят низкую чувствительность данных тестов по сравнению с МАНК.

Таким образом, экспресс-тесты расширяют возможности амбулаторной диагности-

ки и позволяют немедленно назначить лечение. В некоторых случаях эти преимущества превосходят низкую чувствительность данных тестов по сравнению с МАНК.

5.6. Методологии, применяемые исключительно в справочных лабораториях.

5.6.1. Культуральный метод. До начала 1980-х «золотым стандартом» диагностики хламидийной инфекции была инокуляция клинического образца в подверженные инфицированию живые клетки тканевой культуры и инкубация с последующей демонстрацией характерных хламидийных включений. Материал забирали с помощью дакронового тампона или цитощетки и помещали в транспортную среду, например, сахарозо-фосфатно-глутаматный буфер (СФГ, см. приложение 4), содержащий фетальную коровью сыворотку и антибиотики (ванкомицин, гентамицин и нистатин) для подавления роста других бактерий и грибов. Хотя сейчас данный метод должен применяться только в справочных лабораториях, иногда важно уметь получать изоляты микроорганизмов, что требует применения тканевой культуры.

5.6.1.1. Выявление *C. trachomatis* на культуре клеток линии McCoy.

Резервуар для гидролиза (splitting flaks):

- Проверьте среду на стерильность до использования.
- Проверьте заселенность монослоя и убедитесь в отсутствии микробной контаминации.
- Продолжайте работать в стерильных условиях в боксе биологической безопасности. Аспирируйте среду из сливного сосуда с помощью стерильной пипетки и вакуума.
- Промойте монослой 10 мл глюкозо-калиево-натриево- фосфатного раствора и аспирируйте его.
- Добавьте 4 мл трипсина и инкубируйте клетки при комнатной температуре до разрыхления монослоя. Слегка постучите по бокам резервуара для удаления клеток.
- Добавьте 4 мл модифицированной Исковом среды Дудьбекко для инактивации трипсина и хорошо перемешайте. Используйте жидкость для смывания оставшихся клеток с боков резервуара.
- Добавьте 1 мл клеточной суспензии к каждому 165 см² резервуара и доведите общий объем до 75 мл с помощью модифицированной Исковом среды Дудьбекко. Затем посеьте 75 см² резервуара, добавьте 0,5 мл и доведите общий объем до 35 мл.
- Инкубируйте резервуар при 37°C в течение 48-96 часов с плотно зарытыми крышками.

Засевание плашек:

- Повторите пункты 1-6.
- Для засеваания каждой плашки необходимо 15 мл разбавленной клеточной суспензии. Подсчитайте общий объем на основании числа желаемых плашек. Например, для 10 плашек нужно 150 мл модифицированной Исковом среды Дудьбекко. К каждому резервуару нужно добавить 1 мл модифицированной среды Игла; подсчитайте общий необходимый объем на основании числа желаемых резервуаров.
- Для каждых 50 мл модифицированной Исковом среды Дудьбекко в микротитровочных плашках добавьте 1 мл клеточной суспензии из трипсинизированного резервуара (например, для 150 мл среды необходимы 3 мл клеток). Для каждых 100 мл среды в резервуарах добавьте 1 мл клеток.
- Залейте в гематоцитометр разбавленную клеточную суспензию. Сосчитайте 5 квадратов (4 по углам и 1 в середине); среднее число клеток на квадрат умножается на 10⁵, что составляет число клеток на 1 мл. Для микротитровочных плашек необходимо 1-1.4 x 10⁶ клеток\мл (10-14 клеток на квадрат); в случае резервуаров необходимо 7-10 x 10⁵ клеток\мл для слияния за 48 часов. Если число клеток превышает заданное, снизьте концентрацию добавлением модифицированной Исковом среды Дудьбекко или добавьте клеток из резервуара. Пересчитайте содержание клеток, при необходимости, еще раз снизьте концентрацию.
- Добавьте по 200 мкл в каждую лунку. Закройте плашки пленкой. Добавьте 1 мл

к каждому сосуду и плотно прикройте. Инкубируйте при 37°C до использования (48-96 часов).

Инокуляция микротитровочных плашек:

- Проверьте монослой McCoу на целостность. Клетки должны касаться друг друга и местами перекрываться. Среда должна быть чистой.
- В микротитровочном формате можно проверять материал из шейки матки, уретры, влагалища, прямой кишки, ротоглотки и конъюнктивы.
- Провортексируйте образцы в течение 5 с, затем разрушайте ультразвуком в течение 20 секунд. Необходимо надеть защиту на глаза и уши.
- В образцах может быть обнаружена бактериальная контаминация (проявляется помутнением транспортной среды или измерением рН), что приведет к токсическому повреждению тканевой культуры. Данные образцы должны быть проверены в неразбавленном и разбавленном как 1:2 и 1:10 виде (в СФГ).
- Работая в боксе биологической безопасности, поместите половину каждого образца в криососуд, промаркированный тем же номером.
- Аспирируйте плашки со сливающимся монослоем.
- Добавьте 100 мкл к каждому образцу и наложите его на клеточный монослой.
- Каждый образец инокулирован в три последовательных монослоя. После завершения инокуляции в каждой плашке добавьте 200 мкл модифицированной Исковом среды Дудьбекко в каждую ячейку.
- Опечатайте плашки специальной пленкой и центрифугируйте при 1400g 1 час при 30°C. Инкубируйте при 37°C 48 часов.
- Храните образцы при -70°C до момента получения результатов. Все положительные образцы хранятся более 2 недель.
- Удалите среду из плашек. Зафиксируйте монослой метанолом в течение 10 минут. Удалите метанол.

Сосуды для инокуляции:

- Только отдельные образцы подвергаются культуральному исследованию в сосудах. Например, биоптаты эндометрия, маточных труб и лимфатических узлов.
- Проверьте сосуды с клетками McCoу на целостность; клетки должны соприкасаться между собой и быть слегка удлиненными.
- Провортексируйте образцы в течение 5 секунд, затем разрушайте ультразвуком в течение 20 секунд. Во время разрушения ультразвуком следует надеть защиту на глаза и уши.
- В образцах может быть обнаружена бактериальная контаминация (проявляется помутнением транспортной среды или изменением рН), что приведет к токсическому повреждению тканевой культуры. Данные образцы должны быть проверены в неразбавленном и разбавленном как 1:2 и 1:10 виде (в СПГ).
- Работая в боксе биологической безопасности, промаркируйте и аспирируйте три сосуда на образец. Добавьте 0,2 мл к образцу в каждом сосуде. Наложите 1 мл модифицированной Исковом среды Дудьбекко.
- Центрифугируйте при 2500g 1 час при 30°C. Инкубируйте при 37°C 72 часа.
- Храните все образцы при 70°C до получения результатов. Все положительные образцы хранятся длительно.
- Аспирируйте среду из 1 флакона на образец и фиксируйте монослой метанолом в течение 10 минут.
- Прокрасьте флюоресцентными антителами.
- Следуйте инструкции в упаковке препарата по применению специфических антихламидийных антител. В целом:
 - Налейте антисыворотку для фиксации монослоя (после удаления метанола). Внесите в ячейки по 40мкл с использованием мультиканального пипетатора.
 - Инкубируйте при комнатной температуре 30 минут.

- Аккуратно промойте трижды с помощью забуференного фосфатом физиологического раствора.
- Плашки готовы, 13-мм круглые покровные стекла снимаются с сосудов и, с использованием специальной жидкости, помещаются на стеклянные слайды с 22x50 мм покровными стеклами. Окрашенную культуру следует хранить в темноте до момента анализа. Культура должна быть проанализирована в тот же день, что окрашена.

В большинстве лабораторий культуральное исследование не применяется из-за значительно меньшей, чем у МАНК, чувствительности, длительности, инвазивности образцов, более строгих условий проведения для сохранения жизнеспособности *C. trachomatis*, трудности исполнения и отсутствия международных стандартов и контроля качества. Культуральный метод преимущественно используется в судебно-медицинских случаях из-за 100% специфичности (но следует учитывать возможность перекрестной контаминации образцов), а также для оценки излеченности, проводимой через 14 дней после окончания терапии. Фактически, специфичность МАНК такова, что они подходят для судебно-медицинской экспертизы, поэтому полагание на культуральный метод отражает консерватизм законодательных стандартов. Тест на излеченность иногда проводится для оценки эффективности однократного приема лекарственного средства; некоторые последние исследования указывают на субоптимальную эффективность эрадикации 1 г азитромицина. Чаще всего тест на излеченность проводится не ранее, чем через 2-3 недели после лечения и, в большинстве случаев, к данному сроку следы ДНК возбудителя элиминируются из организма. Тем не менее, идеальные сроки проведения теста на излеченность могут отличаться в случае МАНК на основе анализа РНК.

Поэтому теперь, если только изоляты микроорганизмов не используются в исследовательских целях, нет веских доводов в пользу применения культурального метода в повседневной диагностической практике. Это внесено в рекомендации ВОЗ для лабораторий, занимающихся диагностикой ИППП [15].

Изоляты, полученные при проведении культурального метода, должны оставаться в специальных хранилищах для эпидемиологических исследований. Данные исследования могут включать изучение чувствительности к антибиотикам (см. ниже) и генотипирование. Генотипирование можно проводить с помощью молекулярных технологий, а значит, без необходимости в жизнеспособных микроорганизмах [17, 36, 42]. Поэтому в регионах по всему миру также следует организовать и поддерживать хранилища для МАНК-позитивных образцов.

Таким образом, культуральный метод обладает субоптимальной специфичностью по сравнению с коммерчески доступными и международно одобренными МАНК и поэтому не рекомендуется к применению при доступности МАНК. Культуральный метод должен ограниченно применяться в справочных лабораториях, полученные изоляты микроорганизмов будут храниться для последующего фено- и генотипирования в исследовательских целях.

5.6.2. Проверка на чувствительность к антибиотикам. Однозначные доказательства появления приобретенной гомотипической (фенотипической и генотипической) резистентности к рекомендованным антибиотикам у изолятов *C. trachomatis* отсутствуют, хотя подобная устойчивость в отдельных клинических случаях была зафиксирована и служила причиной неэффективности лечения. Более того, проверка на чувствительность к антибиотикам *in vitro* для *C. trachomatis* никогда не проводится по умолчанию, отсутствует универсальный, приемлемый, стандартизованный и воспроизводимый метод оценки качества, а также основанные на доказательной базе корреляции между активностью *in vitro* и *in vivo* (по клиническим результатам терапии) [54].

Проверка на чувствительность *C. trachomatis* к антибиотикам трудоемка, требует экспертизы тканевой культуры и возможна только в справочных лабораториях. Тем не менее, в будущем не исключено возникновение и распространение клинически значимой антибиотикорезистентности. Это обуславливает необходимость соответствующей оценки

текущей чувствительности к антибиотикам и развития эффективных, стандартизованных, объективных и качественных методов, а также отслеживания корреляции между активностью *in vitro* и результатами лечения. Данный метод может быть полезен в будущем для отслеживания возможной антибиотикорезистентности, проведения клинических исследований по эффективности терапии и оценки активности новых антибиотиков *in vitro*. В случае распространения клинически значимой антибиотикорезистентности *C. trachomatis* хранилища изолятов будут полезны для ретроспективной оценки в рамках научных исследований.

5.6.3. Серологический метод. Серологические методы диагностики хламидийной инфекции были одними из самых ранних. Данные методы позволяли выявить антитела к хламидиям и в некоторых случаях определить их титр. Если в первых исследованиях фиксация комплемента и микроиммунофлуоресценция (МИФ) были основаны на выявлении целых микроорганизмов, то последующие анализы позволяли получать положительные результаты в ответ на отдельные белки или классы антител. Серологический метод помогает в *диагностике и скрининге* осложнений хламидийной инфекции (*реактивный артрит, ВЗОМТ, эктопическая беременность, бесплодие из-за трубного фактора*), диагностике пневмонии новорожденных и венерической лимфогранулемы, а также необходим для эпидемиологических исследований, например, для получения кумулятивных данных о подверженности отдельной популяции хламидийной инфекции. Тем не менее, важно всегда расценивать результаты серологических исследований с осторожностью, помня о контексте.

При острой первичной хламидийной инфекции определяются специфические IgM, а также IgG и IgA. Тем не менее, гуморальный иммунный ответ может протекать отсроченно и не определяться после неосложненной урогенитальной инфекции. Напротив, высокий титр антител к *C. trachomatis* может длительное время персистировать после излечения инфекции. Соответственно, из-за низкой чувствительности и специфичности, измерение антител к хламидиям имеет ограниченное значение для диагностики *острой* хламидийной инфекции и не должно использоваться в повседневной диагностике *неосложненной* хламидийной инфекции.

Таким образом, серологический метод не применяется для диагностики *неосложненной* урогенитальной хламидийной инфекции. Серологический метод помогает в *диагностике и скрининге* осложнений хламидийной инфекции, диагностике пневмонии новорожденных и венерической лимфогранулемы, а также применяется в эпидемических исследованиях.

Представленный материал свидетельствует о том, что из прямых методов, существующих в настоящее время для идентификации хламидий (*Chlamydia trachomatis*), наиболее чувствительными и специфичными являются методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), замена которых другими прямыми тестами является неоправданной по выше указанной причине. Не исключается применение ПИФ для анализа мазков с конъюнктивы у новорожденных детей (раздел 5.5.1 Рекомендаций), которая позволяет быстро получать результаты, обладает высокой специфичностью и подходит для выявления нежизнеспособных микроорганизмов. Однако указывается, что ПИФ менее чувствительна, чем МАНК, трудоёмка, имеет низкую пропускную способность, осуществляется только квалифицированным персоналом и имеется риск получения ложноотрицательных результатов из-за некачест-

венного проведения анализа.

В клинической практике чаще встречаются осложнённые формы хламидийной инфекции в виде развития бесплодия, ВЗОМТ, реактивного артрита, эктопической беременности, когда возбудитель находится во внутренних половых органах, не попадает в соскобный материал и, в связи с этим, не может быть идентифицирован даже такими высокочувствительными и высокоспецифичными методами, которыми являются МАНК. В этом случае предпочтение отдаётся косвенным (серологическим) тестам, что обозначено в подразделе 5.6.3 Рекомендаций. Нередко при парной постановке прямого и косвенного тестов положительный результат получается исключительно по серологическому исследованию при отрицательном ПЦР, что отражает общие закономерности формирования иммунного ответа при данном инфекционном процессе и подтверждает недоступность возбудителя для исследования при восходящей инфекции [3, 4, 8]. В этом случае можно провести аналогию со многими инфекциями (герпетическая, сифилис и т.д.), при которых на начальном этапе формируется первичный аффект, а затем – за счёт вирусемии и бактериемии, развивается генерализация инфекции с проникновением возбудителя в различные внутренние органы [2]. В этом случае первичный аффект теряет своё значение как резервуар патогенна, и в связи с этим имеет место достаточно низкая выявляемость возбудителя методами амплификации нуклеиновых кислот и отсутствует корреляция полученных результатов исследований с клинической проблематикой. В то же время специфические серологические тесты нередко объясняют клиническую ситуацию, их результаты коррелируют с клиническими проявлениями инфекции и её осложнениями, а проведенное лечение с их учетом обеспечивает удовлетворительную клиническую эффективность [5, 18, 27, 30, 33-35, 49].

Однако при проведении серологических исследований необходимо учитывать следующие очень важные моменты: 1) не всегда при хламидийной инфекции имеет место определяемый серологическими тестами адекватный Th2-иммунный ответ; особенно это проявляется диссонансом при положительных результатах у половых партнёров внутри семейных пар; 2) серологические тесты могут быть информативны только в случае их первичного проведения (до антибиотикотерапии); после лечения их результаты интерпретировать становится достаточно сложно; 3) достоверность результатов во многом определяется качеством применяемых тест-систем, которое, в свою

очередь, зависит от особенностей технологического процесса по синтезу или очистке используемого антигена: крайне необходимо применять характерный только для *C. trachomatis* видоспецифический белковый антиген, не дающий перекрёстных реакций с антителами против антигенов других видов хламидий семейства *Chlamydiaceae* (из рода *Chlamydia* и рода *Chlamydophila*); в качестве конъюгата чрезвычайно важно применять фосфатазно-щелочной, который на порядок чувствительней пероксидазного [6, 10].

Однако большинство используемых в России отечественных тест-систем, как и многие зарубежные тест-системы, разрешённые к применению в нашей стране, не отвечают указанным требованиям. Кроме того, в инструкциях к ним эти принципиальные позиции чаще всего умалчиваются и не освещаются производителем.

Таким образом, для успешной диагностики осложненной хламидийной инфекции необходимо применять одновременно два метода (МАНК и серологический тест), что находит подтверждение в Рекомендациях ВОЗ 2013 г. Однако отдавать предпочтение какому-либо из выше указанных тестов с учетом характера инфекционного процесса (свежая или хроническая осложнённая инфекция) часто не представляется возможным из-за сложности его оценки. Необходимо помнить о том, что большинство пациентов обращаются уже при наличии осложнённой хламидийной инфекции, при которой МАНК могут давать ложноотрицательные результаты.

Использование серологических тестов при восходящей хламидийной инфекции наиболее информативно в тех случаях, когда диагноз устанавливается впервые и отсутствует упоминание о лечении данной инфекции в анамнезе. Однако применение тест-систем должно быть крайне избирательным с учётом качества используемых антигена и конъюгата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ведение больных инфекциями, передаваемыми половым путём, и урогенитальными инфекциями: клинические рекомендации Российского общества дерматовенерологов и косметологов. М.: Издательский дом «Деловой экспресс», 2012. 112 с.
2. Гавришева Н.А., Антонова Т.В. Инфекционный процесс: Клинические и патофизиологические аспекты: Учебное пособие. СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2006. 282 с.
3. Рищук С.В., Смирнова Т.С., Костючек Д.Ф. и др. Диагностика и установление излеченности половых пар по урогенитальному хламидиозу и микоплазмозу: методические рекомендации для врачей по Северо-Западному региону России. СПб., 2006. 25 с.
4. Рищук С.В. Клинико-лабораторные аспекты хронических воспалительных заболеваний и дисбиозов у половых партнёров. Дисс. ... доктора мед. наук. Санкт-Петербург, 2006. 400 с.

5. Рищук С.В., Дробченко С.Н. Лабораторные маркёры урогенитальной хламидийной инфекции при различных вариантах клинических проявлений у женщин и мужчин. Матер. региональной научно-практической конференции с международным участием «Инновационные технологии в диагностике и лечении кожных заболеваний и инфекций урогенитального тракта». Гродно: ГрГМУ, 2012. С. 107-114.
6. Рищук С.В., Душенкова Т.А. Оптимизация диагностики репродуктивно значимых инфекций у половых пар. TERRA MEDICA. 2013. 4: 20-33.
7. Рищук С.В. Половые инфекции как основная причина ухудшения репродуктивного здоровья семейных пар. TERRA MEDICA. 2013. 3: 5-11.
8. Рищук С.В., Костючек Д.Ф. Половые пары и половые инфекции. СПб.: Медицинская пресса, 2005. 272 с.
9. Рищук С.В., Мирский В.Е. Вспомогательные репродуктивные технологии как ятрогенный фактор ухудшения здоровья детского населения. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2013. 4: 1-16. (URL: <http://elmag.uran.ru/magazine/Numbers/2013-4/Articles/Rishuk-Mirskii-2013-4.pdf>)
10. Рищук С.В. Обоснование методических рекомендаций по оптимизации диагностики репродуктивно значимых инфекций у половых пар. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2013. 3: 1-23. (URL: [http://elmag.uran.ru/magazine/Numbers/2013-3/Articles/RishukSV\(2013-3\).pdf](http://elmag.uran.ru/magazine/Numbers/2013-3/Articles/RishukSV(2013-3).pdf))
11. Домейка М., Савичева А.М., Соколовский Е. и др. Руководство по лабораторной диагностике инфекций урогенитального тракта. СПб.: Изд-во Н-Л, 2012. 288 с.
12. Савичева А.М., Шипицина Е.В., Соколовский Е.В. и др. Лабораторная диагностика урогенитальной хламидийной инфекции: методические рекомендации. СПб.: «Изд-во Н-Л», 2009. 56 с.
13. Хламидийная инфекция: методические рекомендации №36 департамента здравоохранения г. Москвы. Москва, 2014. 20 с.
14. Annan N.T., Sullivan A.K., Nori A. et al. Rectal chlamydia—a reservoir of undiagnosed infection in men who have sex with men. *Sex Transm Infect.* 2009. 85. 3: 176-179.
15. Association of Public Health Laboratories (APHL). Laboratory diagnostic testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Expert consultation meeting summary report, 13-15 January 2009 Atlanta, G.A. Silver Spring, MD, APHL, 2009. (URL: http://www.aphl.org/aphlprograms/infectious/std/Documents/ID_2009Jan_CTGCLab-Guidelines-Meeting-Report.pdf).
16. Bachmann L.H., Johnson R.E., Cheng H. et al. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* rectal infections. *J Clin Microbiol.* 2010. 48. 5: 1827-1832.
17. Bandea C.I., Debattista J., Joseph K. et al. *Chlamydia trachomatis* serovars among strains isolated from members of rural indigenous communities and urban populations in Australia. *J Clin Microbiol.* 2008. 46. 1: 355-356.
18. Baud D., Goy G., Jaton K. et al. Role of *Chlamydia trachomatis* in miscarriage. *Emerg Infect Dis.* 2011. 17. 9: 1630-1635.
19. Black C.M., Marrazzo J., Johnson R.E. et al. Head-to-head multicenter comparison of DNA probe and nucleic acid amplification tests for *Chlamydia trachomatis* infection in women performed with an improved reference standard. *J Clin Microbiol.* 2002. 40. 10: 3757-3763.
20. Boyadzhyan B., Yashina T., Yatabe J.H. et al. Comparison of the APTIMA CT and GC assays with the APTIMA Combo 2 assay, the Abbott LCx assay, and direct fluorescent-antibody and culture assays for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 2004. 42. 7: 3089-3093.
21. Chong S., Jang D., Song X. et al. Specimen processing and concentration of *Chlamydia trachomatis* added can influence false-negative rates in the LCx assay but not in the APTIMA Combo 2 assay when testing for inhibitors. *J Clin Microbiol.* 2003. 41. 2: 778-782.
22. Dodge B., Van Der Pol B., Rosenberger J.G. et al. Field collection of rectal samples for sex-

- ually transmitted infection diagnostics among men who have sex with men. *Int J STD AIDS*. 2010. 21 (4): 260-264.
23. Felder R.A., Foster M.L., Lizzi M.J. et al. Process evaluation of a fully automated molecular diagnostics system. *Journal of the Association for Laboratory*. 2009. 14 (5): 262-268.
 24. Gaydos C.A., Cartwright C.P., Colaninno P. et al. Performance of the Abbott RealTime CT/NG for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol*. 2010. 48 (9): 3236-3243.
 25. Gaydos C.A., Crotchfelt K.A., Shah N. et al. Evaluation of dry and wet transported intravaginal swabs in detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in female soldiers by PCR. *J Clin Microbiol*. 2002. 40 (3): 758-761.
 26. Gaydos C.A., Quinn T.C., Willis D. et al. Performance of the APTIMA Combo 2 assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in female urine and endocervical swab specimens. *J Clin Microbiol*. 2003. 41 (1): 304-309.
 27. Geisler W.M., Morrison S.G., Doemland M.L. et al. Immunoglobulin-specific responses to *Chlamydia* elementary bodies in individuals with and at risk for genital chlamydial infection. *J Infect Dis*. 2012. 206 (12): 1836-43.
 28. Gift T.L., Pate M.S., Hook E.W. et al. The rapid test paradox: when fewer cases detected lead to more cases treated: a decision analysis of tests for *Chlamydia trachomatis*. *Sex Transm Dis*. 1999. 26 (4): 232-240.
 29. Hobbs M.M., van der Pol B., Totten P. et al. From the NIH: proceedings of a workshop on the importance of self-obtained vaginal specimens for detection of sexually transmitted infections. *Sex Transm Dis*. 2008. 35 (1): 8-13.
 30. Horner P., Soldan K., Vieira S.M. et al. *C. trachomatis* Pgp3 antibody prevalence in young women in England, 1993-2010. *PLoS One*. 2013. 8 (8): 72001.
 31. Horner P., Skidmore S., Herring A. et al. Enhanced enzyme immunoassay with negative-gray-zone testing compared to a single nucleic acid amplification technique for community-based chlamydial screening of men. *J Clin Microbiol*. 2005. 43 (5): 2065-2069.
 32. Huppert J., Hesse E., Gaydos C.A. What's the point? How point-of-care STI tests can impact infected patients. *Point Care*. 2010. 9 (1): 36-46.
 33. Idahl A., Boman J., Kumlin U. et al. Demonstration of *Chlamydia trachomatis* IgG antibodies in the male partner of the infertile couple is correlated with a reduced likelihood of achieving pregnancy. *Hum Reprod*. 2004. 19 (5): 1121-1126.
 34. Joyee A.G., Thyagarajan S.P., Vikram Reddy E. et al. Diagnostic utility of serologic markers for genital chlamydial infection in STD patients in Chennai, India. *J Assoc Physicians India*. 2007. 55: 777-780.
 35. Komoda T. Kinetic study of antibodies (IgG, IgA) to *Chlamydia trachomatis*: importance of IgA antibody in screening test for *C. trachomatis* infection by peptide-based enzyme immunoassay. *Jpn J Infect Dis*. 2007. 60 (6): 347-351.
 36. Lima H.E., Oliveira M.B., Valente B.G. et al. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from endocervical specimens in Brazil. *Sex Transm Dis*. 2007. 34. (9): 709-717.
 37. Mahony J., Chong S., Jang D. et al. Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription-mediated amplification: identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. *J Clin Microbiol*. 1998. 36 (11): 3122-3126.
 38. Marshall R. et al., eds. New automated real time PCR technology for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. 11th International Symposium on Human Chlamydial Infections. Niagra-on-the-Lake, Ontario, 2006.
 39. Martin D.H., Nsuami M., Schachter J. et al. Use of multiple nucleic acid amplification tests to define the infected-patient "gold standard" in clinical trials of new diagnostic tests for *Chlamydia trachomatis* infections. *J Clin Microbiol*. 2004. 42 (10): 4749-4758.
 40. Masek B.J., Arora N., Quinn N. et al. Performance of three nucleic acid amplification tests

- for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by use of self-collected vaginal swabs obtained via an Internet-based screening program. J Clin Microbiol. 2009. 47 (6): 1663-1667.
41. Mimiaga M.J., Helms D.J., Reisner S.L. et al. Gonococcal, chlamydia, and syphilis infection positivity among MSM attending a large primary care clinic, Boston, 2003 to 2004. Sex Transm Dis. 2009. 36 (8): 507-511.
 42. Pedersen L.N., Herrmann B., Møller J.K. Typing *Chlamydia trachomatis*: from egg yolk to nanotechnology. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009. 55 (2): 120-130.
 43. Reischl U., Straube E., Unemo M. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis* (nvCT) remains undetected by many European laboratories as revealed in the recent PCR/NAT ring trial organised by INSTAND e.V., Germany. Euro Surveill. 2009. 14 (32): pii:19302.
 44. Ripa T., Nilsson P. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. Euro Surveill. 2006. 11 (11): E 061109.2.
 45. Rosenberger J.G., Dodge B., Van Der Pol B. et al. Reactions to self-sampling for ano-rectal sexually transmitted infections among men who have sex with men: a qualitative study. Arch Sex Behav. 2011. 40 (2): 281-288.
 46. Schachter J., Hook E.W., Martin D.H. et al. Confirming positive results of nucleic acid amplification tests (NAATs) for *Chlamydia trachomatis*: all NAATs are not created equal. J Clin Microbiol. 2005. 43 (3): 1372-1373.
 47. Schachter J., McCormack W.M., Chernesky M.A. et al. Vaginal swabs are appropriate specimens for diagnosis of genital tract infection with *Chlamydia trachomatis*. J Clin Microbiol. 2003. 41 (8): 3784-3789.
 48. Schachter J., Moncada J., Liska S. et al. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of chlamydial and gonococcal infections of the oropharynx and rectum in men who have sex with men. Sex Transm Dis. 2008. 35 (7): 637-642.
 49. Siam EM1, Hefzy EM. The relationship between antisperm antibodies prevalence and genital chlamydia trachomatis infection in women with unexplained infertility. Afr J Reprod Health. 2011. 15 (3): 93-101.
 50. Unemo M., Clarke I.N. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*. Curr Opin Infect Dis. 2011. 24 (1): 62-69.
 51. Unemo M., Rossouw A., James V. et al. Can the Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis* (nvCT) be detected by UK NEQAS participants from seventeen European countries and five additional countries/regions in 2009? Euro Surveill. 2009. 14 (19): pii:19206.
 52. Unemo M., Seth-Smith H.M., Cutcliffe L.T. et al. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*: genome sequence, morphology, cell tropism and phenotypic characterization. Microbiology. 2010. 156. Pt. 5: 1394-1404.
 53. Van Der Pol B., Ferrero D.V., Buck-Barrington L. et al. Multicenter evaluation of the BDProbeTec ET System for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens, female endocervical swabs, and male urethral swabs. J Clin Microbiol. 2001. 39 (3): 1008-1016.
 54. Wang S.A., Papp J.R., Stamm W.E. et al. Evaluation of antimicrobial resistance and treatment failures for *Chlamydia trachomatis*: a meeting report. J Infect Dis. 2005. 191 (6): 917-923.
 55. WHO. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus / Edited by Magnus Unemo, Ronald Ballard, Catherine Ison et al. Printed by the Document Production Services, Geneva, Switzerland. 2013. 228 p.

Поступила 22.09.2014

(Контактная информация:

Ришук Сергей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии имени С.Н. Давыдова Северо-Западного государственного ме-

дицинского университета имени И.И. Мечникова Минздрава России; адрес: Россия, 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41; тел.: +7 911 232-85-63; e-mail: s.rishchuk@mail.ru; (переписка);

Важбин Лев Борисович – главный врач государственного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной клинический кожно-венерологический диспансер», главный специалист – дерматовенеролог министерства здравоохранения Московской области, президент Ассоциации главных врачей кожно-венерологических диспансеров Московской области, Россия, 129110, Москва, ул. Щепкина д.61/2. корп. 2, тел.: +7 919 773-75-76; e-mail: lev.50@mail.ru

Ахунова Наиля Рашитовна – кандидат медицинских наук, врач-дерматовенеролог Московского областного клинического кожно-венерологического диспансера; адрес: Россия, 129110, Москва, ул. Щепкина, д.61/2, корп. 2; тел.: +7(916)8730388 akhunova@mail.ru;

Полянская Альбина Александровна – врач-дерматовенеролог, косметолог клиники «Премиум эстетикс», Москва, Казарменный переулок, д.3, стр. 6, тел.: +7(499) 346-02-92, e-mail: plnsk@yandex.ru)