

## СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

**Рицук С.В.** доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства, гинекологии, перинатологии и репродуктологии ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

Серологический метод диагностики хламидийной инфекции рекомендуется ВОЗ и успешно используется при тяжелых воспалительных заболеваниях урогенитальной сферы, в установлении диагноза персистирующей, бессимптомной, вялотекущей инфекции или хронических последствий заболеваний, вызванных *Chlamydia trachomatis* (осложнений, возникающих в результате восходящей инфекции), когда другие методы лабораторной диагностики не эффективны и не позволяют выявить антигены или ДНК/РНК *Chlamydia trachomatis*, или живые микроорганизмы [WHO 2013, Geisler W.M. et al. 2012, Broeze K.A. et al. 2012, Coppus S. et al. 2011, Stamm W.E. 2008, Mei B. et al 2009, Land J.A. et al. 2010, Broeze K.A. et al. 2011, Baud D. et al. 2011, Den Hartog J.E. et al 2008, Keltz M et al 2006, Nederlandse Vereniging voor Obstetrie en Gynaecologie. Oriënterend fertilititsonderzoek 2004, Forrester B. et al. 2006, Smelov V. et al 2008, Koedijk FD. et al. 2007, Svenstrup, H.F. et al 2008, Idahl A. et al. 2004, Idahl A. 2009, Perquin D.A. et al. 2007, Hakim E.A, 2009, Broeze K.A et al. 2011, Ray K. 2006, Horner P et al. 2013, US Preventative Task Force Screening for chlamydia infection. 2013, House of Commons Committee of Public Accounts. Young people's sexual health: the National Chlamydia Screening Programme. 2013, Немченко О.И. 2007, Кухтинова Н. В. и др. 2004., Сельков С. А. 2001, Кубанова А.А. и др. 2004, Пашко Ю.П., 2010]. В таких случаях серологический анализ дает исчерпывающий ответ, снижая возможность ложной интерпретации отрицательных результатов лабораторного анализа при прямом определении антигена или ДНК/ РНК возбудителя. Данный метод уменьшает необходимость использования инвазивных процедур, которые требуются для прямого детектирования антигена, ДНК/РНК возбудителя, а, соответственно, и проблем, связанных с техникой взятия образца (эффективности соскоба) и его транспортировки.

Наиболее информативным серологическим методом является иммуноферментный метод определения специфических IgG и IgA антител к *Chlamydia trachomatis* в сыворотке, плазме или цельной крови [Исаков В. А., Куляшова Л. Б., и др., 2010; Ткаченко С.Б., Савичева А. М., и др. , 2006; Михайличенко В. В., Бойцов А.Г., Есипов А.С., 2000]. Определение IgM антител к *Chlamydia trachomatis* в практическом здравоохранении имеет ограниченное значение, из-за невысоких уровней и короткого времени выработки антихламидийных антител класса М [Black CM., 1998]. В диагностике острой хламидийной инфекции рекомендуется

использовать методы детекции ДНК/ РНК возбудителя [Руководство по лабораторной диагностике инфекций , 2012; Инфекции, передаваемые половым путем , 2010; Протокол ведения больных, 2011].

### **Параметры выбора тест-системы для иммуноферментного анализа.**

Для серодиагностики хламидийных инфекций используют коммерческие ИФА-тест-системы, позволяющие выявлять родоспецифические или видоспецифические антитела различных классов. Сегодня в Российской Федерации зарегистрировано и разрешено к применению достаточно большое количество ИФА тест-систем как Российских, так и зарубежных производителей (см. таблицу 1). Производители тест-систем могут говорить о высокой чувствительности и специфичности, при этом не существует требований предоставлять информацию об объеме выборки или доверительных интервалах, о прогностической ценности положительного результата (PPV) и отрицательного результата (PNV). Меньше половины стран во всем мире имеют регулируемую систему для *in vitro* диагностики инфекционных заболеваний. Не существует утвержденных международных протоколов для оценки диагностических тестов. Определенные требования к качеству тест-систем предъявляются при сертификации CE для продажи в странах Европы, требования FDA для использования в США. Процесс государственного регулирования в России сегодня не достаточно обеспечивает гарантии качества и характеристик диагностических тест-систем. Каждая лаборатория вынуждена сама выбирать тест-системы того или другого производителя.

Попробуем проанализировать принцип ИФА и вникнуть в инструкции по использованию тест-систем.

### **В чем отличие иммуноферментного анализа?**

Основной отличительной чертой иммуноферментного анализа является то, что комплекс антиген-антитело выявляется с помощью субстрата, который расщепляется ферментом с появлением окрашивания (ферментативное окрашивание). При ферментативном окрашивании для достижения окраски требуется меньшее количество комплексов антиген-антитело, так как каталитические свойства ферментов позволяют действовать им в качестве усилителей: одна молекула фермента может способствовать образованию более  $1 \times 10^5$  молекул продукта каталитической реакции в минуту, что обуславливает высокую чувствительность ИФА. Как показывают многочисленные сравнительные исследования, она выше чувствительности иммунохроматографических, иммунофлуоресцентных и радиоиммунологических методов [Komoda T., 2007; Verkooyen RP et al., 2002; Манзенюк И.Н., Воробьева

М.С. и др. 2004; Дробченко С.Н., Савичева А.М., Шипицына Е.В. и др. С.Б. , 2007; Дробченко С.Н., Ткаченко С.Б., Савичева А.М., 2010; Дробченко С.Н., Савичева А. М., Шипицына Е.В., Шалепо К.В, Ткаченко С.Б., 2011]. В связи с тем, что фермент обладает уникальным своего рода усиливающим свойством, чувствительность иммуноферментных методик зависит от правильного выбора фермента. Выбор той или иной фермент- субстратной пары, использованной в конкретной тест-системе, диктуется несколькими соображениями. Во-первых, это стабильность в процессе анализа и хранения как крайне чувствительного к структурным внутримолекулярным перестройкам конъюгата, меченного ферментом, так и во многих случаях светочувствительного субстрата. Во- вторых, наличие соответствующей регистрирующей аппаратуры. В-третьих, выбор той или иной фермент-субстратной пары диктуется естественным желанием клинициста иметь в руках систему, обладающую максимальной специфичностью и чувствительностью.

Для производства ИФА тест-систем наиболее часто используются такие ферменты как пероксидаза и щелочная фосфатаза.

Ферменты, используемые в ИФА тест-системах для выявления антител к *Chlamydia trachomatis*, разрешенных к применению в России и приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Ферменты, используемые в ИФА тест-системах для выявления антител к *Chlamydia trachomatis*, разрешенных к применению в России.

| <b>Производитель</b>        | <b>Страна</b> | <b>ИФА тест-система</b>                                | <b>Фермент, связанный с конъюгатом</b> |
|-----------------------------|---------------|--|--|
| Вектор-Бест                 | Россия        | ХламиБест С. trachomatis IgM; IgA; -IgG                | Пероксидаза хрена                      |
| Диагностически<br>е системы | Россия        | ДС-ИФА-анти-ХЛАМИДИЯ TR-A; TR-<br>M; TR-G              | Пероксидаза хрена                      |
| ЭКОлаб                      | Россия        | ИФА-Хламидия-IgA; IgG                                  | Пероксидаза хрена                      |
| МБС                         | Россия        | Хлами-IgA-ДС-Tr, IgG-ДС-Tr                             | Пероксидаза хрена                      |
| ИмДи-спектр                 | Россия        | Хламидиоз-IgM-трахоматис                               | Пероксидаза хрена                      |
| Хема                        | Россия        | Chlamydia IgG-ИФА                                      | Пероксидаза хрена                      |
| Биотехлит                   | Россия        | Chl. trachomatis IgG/IgM                               | Пероксидаза хрена                      |
| Institut Virion             | Германи<br>я  | SERION ELISA classic Chlamydia<br>trachomatis IgA, IgG | Щелочная фосфатаза                     |

|                      |          |   |                    |
|----------------------|----------|---|--------------------|
| Savyon diagnostics   | Израиль  | SeroFIA C. trachomatis  | Пероксидаза хрена  |
| DRG Instruments      | Германия | Chlamydia trachomatis IgM; IgA; IgG   | Пероксидаза хрена  |
| MEDAC                | Германия | Chlamydia-IgA,-IgG,-IgM-rELISA medac  | Пероксидаза хрена  |
| EUROIMMUN            | Германия | Anti-Chlamydia trachomatis ELISA  | Пероксидаза хрена  |
| NovaTec              | Германия | Chlamydia trachomatis IgM NovaLisa<br>Chlamydia trachomatis IgA NovaLisa<br>Chlamydia trachomatis IgG NovaLisa  | Пероксидаза хрена  |
| Orgenics (Ордженикс) | Израиль  | ImmunoComb® II Chlamydia trachomatis IgA<br>ImmunoComb® II Chlamydia trachomatis IgG<br>ImmunoComb® II Chlamydia trachomatis Monovalent IgA<br>ImmunoComb® Chlamydia Bivalent IgG | Щелочная фосфатаза |

Все Российские и часть зарубежных производителей используют иммуноферментные конъюгаты на основе пероксидазы хрена. Это, вероятно, связано с доступностью сырья для выделения этого фермента, относительно невысокой стоимостью его, легкостью очистки, достаточно высокой стабильностью, и большим выбором субстратов. Тем не менее, следует подчеркнуть, что другой фермент - щелочная фосфатаза, имеет целый ряд преимуществ перед пероксидазой. Это, во-первых, более высокая стабильность, растворимость и не токсичность используемых при этом субстратов, а, во-вторых, возможность использования хромогенного субстрата с высокой удельной хромофорной активностью (высокий коэффициент молярной экстинкции окрашенного конечного продукта), применение которого резко повышает чувствительность анализа. Французское агентство по контролю за медикаментами (ADA), оценивая тесты, разрешенные для использования в клиниках Европы, подчеркивает, что использование фосфатазно-щелочного конъюгата позволяет достичь наиболее высокой чувствительности по сравнению с тестами, основанными на пероксидазной реакции [Дробченко С.Н., Ривец Б., Сэмюэльс Ф., 2010]. Наши собственные исследования также подтвердили, что предпочтение необходимо отдавать тестам, основанным на использовании фосфатазно-

щелочного конъюгата, как наиболее чувствительным в плане детекции специфических антихламидийных антител [Ришук С.В. и др...]. Среди производителей ИФА тест-систем, зарегистрированных в России, только фирма Organics, Израиль и Institut Virion, Германия применяют конъюгат щелочной фосфатазы. Ведущий производитель Abbott Laboratories использует конъюгат щелочной фосфатазы для качественного определения антигена *Chlamydia trachomatis*. Конечно, чувствительность ИФА тест-систем зависит не только от типа выбранной фермент - субстратной пары, но и от таких факторов, как способа синтеза конъюгата, гомогенности и удельной активности используемых антител и антигенов, а также многочисленных параметров проведения анализа (способа иммобилизации антигена, степени солюбилизации в биологическом или клиническом образце и т. д.).

Специфичность диагностической тест-системы определяется в основном чистотой и гомогенностью используемых **антигенов**. Также можно сказать и об используемых в ИФА иммуноглобулинах, - желательно использовать не цельные сыворотки и даже не суммарные гаммаглобулиновые фракции этих сывороток, а аффинноочищенные или моноклональные антитела.

Большинство ИФА тест-систем предназначены для выявления родоспецифических антител ко всем видам хламидий. В качестве антигенов для таких тест-систем используют очищенные лизаты клеток хламидий или более высокоспецифичный **рекомбинантный фрагмент хламидийного липополисахарида**, не дающий перекреста с липосахаридами других грамотрицательных бактерий. В связи с этим тест-системы, основанные на использовании родоспецифического антигена хламидий, не дают информацию о том, каким видом хламидий вызвана инфекция, т. к. между различными видами могут наблюдаться перекрестные реакции. Известно, что более 70% населения имеют антитела к хламидиям, при этом большая доля (до 60-80%) людей имеют антитела к *S. pneumonia* (без клинической симптоматики), тогда как средние значения содержания антител к *S. trachomatis* составляют в популяции около 21%, сильно варьируя в различных группах населения [Freidank M. H., Holtje M. et al., 1996]. В связи с этим при уточнении диагноза необходимо проводить межвидовую дифференцировку между *S. trachomatis* и *S. pneumonia*. Для дифференцировки между *S. pneumonia* и *S. trachomatis* требуются тесты, направленные на определение видоспецифических антител к тому или иному виду хламидий. При производстве видоспецифических тест-систем в качестве антигенов используют синтетические иммунодоминантные пептиды, соответствующие различным серотипам, которые не имеют гомологии с другими видами хламидий; рекомбинантные белки или очищенные элементарные тельца, специфичные для

определенного вида хламидий. Тест-системы, сконструированные на основе **видоспецифических белков или эпитопов *C. trachomatis***, позволяют определять **видоспецифические антитела**.

Как видно из таблицы, тест-системы, основанные на планшетном иммуноферментном анализе, выпускаются рядом производителей. Методика постановки ИФА приводится в инструкции к каждому конкретному набору и включает, как правило, следующие основные этапы:

1. Инкубация соответствующего разведения сыворотки крови обследуемого на планшете с сенсibilизированным хламидийным антигеном для взаимодействия с ним специфических противохламидийных антител — образование комплекса антиген антитело (АГАТ);

2. Отмывание планшета от несвязавшихся иммуноглобулинов;

3. Инкубация образовавшегося комплекса АГ-АТ с конъюгатом: антисывороткой к иммуноглобулинам человека (общим или какого либо определенного класса, в зависимости от того, определяется ли просто факт наличия АТ к хламидиям или наличие АТ, относящихся к определенному классу иммуноглобулинов А, М, G), меченой ферментом;

4. Отмывание планшета от не связавшихся меченых антител;

5. Проведение ферментативной биохимической реакции, в результате которой образуется цветной продукт.

Интенсивность окраски раствора соответствует количеству фермента в реакционной смеси и, следовательно, количеству образовавшихся комплексов АГ-АТ, число которых определяется содержанием противохламидийных антител в сыворотке крови обследуемого.

Данные тест-системы требуют специального оборудования, подготовки реагентов и достаточно большого времени для постановки анализа. ИФА методы сравнительно просты в выполнении, не требуют значительных временных затрат (время реакции от момента взятия материала до получения ответа составляет 1,5-3,5 часа). Необходимо отметить, что в большинстве производимых сегодня планшетных ИФА тест-систем в качестве антигена твердой фазы используется трисахаридный фрагмент липополисахаридного антигена хламидий, структура которого сходна у всех видов, входящих в семейство *Chlamydiaceae*. Использование этих тестов не дает возможности установить, каким видом хламидий вызвано заболевание.

Технология производства иммуноферментных тест - систем ИммуноКомб защищена патентами фирмы Organics, поэтому в мире не существует аналогов. ИФА тест - системы ИммуноКомб выполнены в оригинальном формате ИммуноГребней. Такой формат, с твердой фазой ИФА анализа, расположенной на выступах-зубцах полимерного Гребня, позволяет переносить твердую фазу между растворами реагентов, необходимых для проведения ИФА. Все необходимые реагенты: разбавитель образца, промывочные растворы, конъюгат, окрашивающий субстрат помещены производителем в лунки планшеты - Проявочной Ванны. В отличие от планшетного ИФА, где в лунки планшеты, содержащей твердую фазу анализа, последовательно заливаются необходимые реагенты, перенос твердой фазы между лунками планшеты, содержащей готовые растворы, значительно проще осуществлять вручную, без использования дорогостоящего оборудования. При этом процесс промывки от неспецифических взаимодействий и образование комплекса на твердой фазе - Гребне обеспечивает более высокую специфичность и чувствительность. Это позволило фирме Organics создать и запатентовать тест, воспроизводящий классический ИФА без использования оборудования за меньшее время (46 минут) и с возможностью индивидуального анализа. Для обеспечения высокой чувствительности тестов ИммуноКомб подобрана ферментативная реакция с использованием фосфатазно-щелочного конъюгата. Результаты анализа проявляются в виде серо-голубых точек на зубцах Гребня, при этом окраска формируется на твердой фазе и стабильна после остановки реакции, что позволяет документировать результаты анализа. Результат оценивается на приборе КомбСкан или визуально. Формирование окраски непосредственно на твердой фазе позволяет проводить визуальное считывание результата, и значительно упростить оборудование для автоматического считывания результата. В тесте предусмотрен также внутренний контроль (третья точка), подтверждающий достоверность проведенного анализа и сохранность реагентов во время транспортировки и хранения.

Технология ИммуноКомб специально разрабатывалась для выявления антител на ранних стадиях сероконверсии. При синтезе и нанесении на твердую фазу-Гребень антигенов были учтены особенности первых антител, которые отличаются от антител, образующихся на более поздних стадиях иммунного ответа (различные изотипы синтезированных антител, различная аффинность и авидность, направленность на различные эпитопы антигенов). Таким образом, применение тестов ИммуноКомб уменьшает количество ложноположительных результатов, которые особенно нежелательны при обследовании и назначении лечения беременных. В тест-системах ImmunoComb® II Chlamydia trachomatis Monovalent IgA использует антигены штамма серотипа L2, с последующим

удалением липосахаридной части LPS, вызывающей перекрестные взаимодействия с родоспецифичными инфекциями. Что позволяет проводить **видоспецифическое** количественное определение IgA антител к *C. trachomatis*. В тест-системе ImmunoComb® Chlamydia Bivalent IgG используются антигены двух различных штаммов, нанесенных отдельно (в двух точках):

- Штамм серотипа L2 (*Chlamydia trachomatis*)
- Штамм IOL 207 (TWAR, *Chlamydia pneumoniae*)

Выделение и удаление из используемых в тест-системе антигенов липополисахаридной фракции, общей для этих двух штаммов, позволяет проводить видоспецифичную дифференциальную диагностику *C. trachomatis* и *C. pneumoniae*. Это особенно важно, т. к. с возрастом у абсолютного большинства людей выявляются антитела к *C. pneumoniae* [Freidank M. H., Holtje M. et al., 1996] в различных титрах, при этом отсутствуют клинические проявления. Поэтому серологическое исследование посредством определения видоспецифических антител к *C. trachomatis* является наиболее эффективным методом диагностики урогенитального хламидиоза, особенно при инфекциях верхних отделов урогенитального тракта. Метод позволяет охарактеризовать присутствие инфекции, ее стадию и назначить соответствующее лечение.

### **Состав набора ИммуноКомб:**

Три пластиковых Гребня, по 12 зубцов, по зубцу на каждый тест. Каждый зубец сенсibilизирован в двух местах: верхняя точка – Внутренний Контроль, нижняя точка – инактивированными видоспецифическими антигенами *C. trachomatis*

Три проявочные ванны, покрытые алюминиевой фольгой, состоящие из 6 рядов (А - F) в каждом по 12 ячеек (каждая ячейка для отдельного образца). Все ряды содержат готовые к использованию растворы реагентов:

Ряд А - растворитель образца,

Ряд В - промывочный раствор,

Ряд С - козьи антитела к IgG или к IgA человека, меченые щелочной фосфатазой,

Ряд D - промывочный раствор,

Ряд E - промывочный раствор,

Ряд F - раствор субстрата - окрашивающего вещества, содержащий 5-бром-



4-хлор-3-индолил фосфат (BCIP) и нитро синий тетразол (NTB).

Положительный контроль - 1 флакон (красная крышка) - разбавленная инактивированная человеческая плазма, положительная по искомым антителам.

Отрицательный контроль - 1 флакон (зеленая крышка) - разбавленная инактивированная человеческая плазма, отрицательная по искомым АТ/АГ.

Перфоратор - для вскрытия алюминиевой фольги, покрывающей лунки Проявочной ванны.

Шкала CombScale® для количественного считывания результатов анализа.

Типовой набор реагентов ИммуноКомб позволяет проводить анализ по единому плану, варьируя длительность и температуру инкубации в зависимости от типа набора:

1. Разорвите алюминиевую упаковку Гребня у надсеченного края. Извлеките Гребень.



Вы можете использовать Гребень и Проявочную Ванну целиком либо использовать только часть Гребня и ячеек Проявочной Ванны. Чтобы использовать часть Гребня:

а. Подсчитайте, сколько зубцов вам потребуется для анализа образцов и контролей. Вам потребуется по одному зубцу на анализ. На каждом зубце изображен кодовый номер анализа для того, чтобы всегда можно было определить к какому набору принадлежит отдельный зубец.

б. Согните Гребень по вертикали и сломайте или отрежьте ножницами требуемое число зубцов.

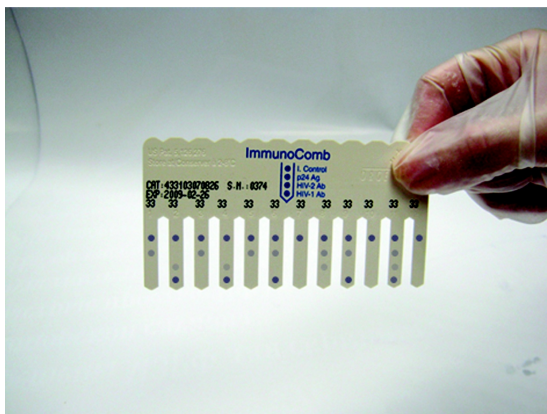
2. Образец (сыворотка, плазма или цельная кровь) в количестве 10-25мкл в зависимости от выявляемого агента вносится в ячейки первого ряда Проявочной Ванны.



3. Гребень вставляется в ряд А и инкубируется (реакция антиген-антитело).



4. Гребень перемещается из ряда в ряд ванночки в соответствии с инструкцией (промывки и связывание с конъюгатом). Цветная реакция в ряду F. Результат анализа в виде окрашенных точек.



Верхняя точка: внутренний контроль. Должна присутствовать и при положительных и при отрицательных образцах. Она подтверждает правильность

работы тест-системы.

Нижняя точка (одна или две) появляется в случае наличия инфекции:

В наборах ImmunoComb® Chlamydia Bivalent IgG: Верхняя точка - Внутренний контроль, средняя точка IgG антитела к антигену *S. pneumoniae*, нижняя точка IgG антитела к антигену *S. trachomatis*.

В наборах ImmunoComb® Chlamydia trachomatis IgG: Верхняя точка - Внутренний контроль, нижняя точка IgG антитела к антигену *S. trachomatis*.

В наборах ImmunoComb® II Chlamydia trachomatis Monovalent IgA ImmunoComb® Chlamydia trachomatis IgA: Верхняя точка - Внутренний контроль, нижняя точка IgA антитела к антигену *S. trachomatis*.

Внутренний и внешний контроль качества работы тест - системы:

Положительный контроль и отрицательный контроль должны использоваться при анализе каждой группы исследуемых сывороток (плазмы). На зубце с положительным контролем должны быть два (или три) пятна: верхнее - внутренний контроль, среднее и/или нижнее - специфический положительный контроль. На зубце с отрицательным контролем появится только верхнее пятно (внутренний контроль), а среднего и/или нижнего пятна вовсе не должно быть либо оно будет очень слабым (еле заметным). Верхнее пятно также должно появиться на всех остальных (опытных) зубцах, тем самым подтверждая, что набор работает правильно.

Уровень видоспецифичных антител в каждом образце оценивается количественно с помощью цветной шкалы КомбСкейл, входящей в состав набора.

Тесты ИммуноКомб сертифицированы CE и широко используются более чем в ста странах мира.

Необходимо учитывать, что отдельный серологический тест не может быть использован для цели конечной диагностики, но исследование парных сывороток в динамике позволяет установить острую, хроническую стадии, реинфекцию или перенесенную инфекцию. При постановке окончательного диагноза инфекций, вызванных *S. trachomatis*, с использованием серологических методов анализа рекомендуется проводить определение IgA и IgG одновременно. Наличие невысоких уровней IgG в сыворотке человека может свидетельствовать о ранее перенесенной инфекции, проведенной терапии антибиотиками и т. д. из-за длительного (до 3-6 месяцев) сохранения антител в крови. Четкое нарастание IgG в парных сыворотках (в 3-4 раза от первоначального уровня) свидетельствует об активном течении хламидийной инфекции. В этом случае необходимо

параллельное исследование на IgA. Высокий уровень IgA подтвердит активное течение хламидийной инфекции или рецидив хламидиоза. При лечении осложнений, вызванных восходящей хламидийной инфекцией, определение IgA и IgG может обеспечивать контроль излеченности пациентов. Выявление 2-3-кратного снижения уровня А и/или G антител при исследовании в парных сыворотках может свидетельствовать об успешно проведенной терапии. Противохламидийные антитела могут сохраняться в организме после излечения до года и более.

В последние годы, для выявления персистирующей хламидийной инфекции определяют антитела к белку теплового шока HSP60. Однако на сегодняшний день остается малоизученной роль персистирующей хронической хламидийной инфекции, вызванной абберантными формами *C. trachomatis*, экспрессирующими антиген HSP60. Данный антиген характеризуется высокой (почти 50%) гомологией с аминокислотным составом человеческого белка теплового шока [Freidank M. H., Holtje M. et al., 1996]. Имеются данные, что анти-Chsp60-антитела выявляются при БА и атеросклерозе, а сам Chsp60 способен активировать функцию макрофагов и индуцировать гиперреактивность бронхов. До сих пор неоднозначна роль выявления антител к белку теплового шока в установлении диагноза урогенитального хламидиоза [Freidank M. H., Holtje M. et al., 1996; La Rue R.W., B.D. Dill, D.K. Giels, J.D. Whittimore et al., 2007; Kinnunen A. , H.M. Surcel, M. Halttunen et al., 2003; Wills GS, Horner PJ, Reynolds R, et al., 2009; Idahl A., Abramsson L., Kumlin U., Liljeqvist J. A., Olofsson J. I., 2007].

1. World Health Organization 2013, Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus, Chlamydial infections :55-73.

2. 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. *Journal of Infectious Diseases Advance* 2012, 8:1-25.

3. Broeze K.A., Opmeer B.C., Coppus S.F., Van Geloven N., Den Hartog J.E., Land J.A., et al., Integration of patient characteristics and the results of Chlamydia antibody testing and hysterosalpingography in the diagnosis of tubal pathology: an individual patient data meta-analysis. *Human Reproduction* 2012, 27: 2979-2990

4. Coppus S., Land J., Opmeer B., Steures P., Eijkemans R., Hompes P., van der Veen F., Mol B.W., van der Steeg J. W., Chlamydia trachomatis IgG seropositivity is associated with lower natural conception rates in ovulatory women without visible tubal pathology. *Human Reproduction* 2011, 26: 3061-307

5. Stamm WE: Lymphogranuloma Venereum. In *Sexually Transmitted Diseases*.

New York: Mc Graw Hill Medical; 2008:595-606.

6. Mei, B., et al., Association of MICA gene polymorphisms with Chlamydia trachomatis infection and related tubal pathology in infertile women. *Human Reproduction* 2009, 24:3090-5.

7. Land, J.A., et al., Epidemiology of Chlamydia trachomatis infection in women and the cost-effectiveness of screening. *Human Reproduction Update* 2010, 16:189-204.

8. Broeze, K.A., et al., Chlamydia antibody testing and diagnosing tubal pathology in subfertile women: an individual patient data meta-analysis. *Human Reproduction* 2011, 17:301-10.

9. Baud D., Goy G., Jatou K., Osterheld M-C., Blumer S., Borel N., Vial Y., Hohlfeld P., Pospischil A., and Greub G., Role of Chlamydia trachomatis in Miscarriage. *Emerging Infectious Diseases* 2011, Vol. 17, No. 9, 1631-35

10. Den Hartog JE, Lardenoije CM, Severens JL, Land JA, Evers JL, Kessels AG. Screening strategies for tubal factor subfertility. *Hum Reprod* 2008; 23:1840-1848.

11. Keltz MD, Gera PS, Moustakis M. Chlamydia serology screening in infertility patients. *Fertil Steril* 2006; 85:752-4.

12. Nederlandse Vereniging voor Obstetrie en Gynaecologie. Oriënterend fertiliteitsonderzoek [Dutch Society for Obstetrics and Gynaecology: guideline diagnostic fertility workup] 2004

13. Forrester B, Pawade J, Horner P: The potential role of serology in diagnosing chronic lymphogranuloma venereum (LGV): a case of LGV mimicking Crohn's disease., *Sex Transm Infect* 2006, 82:139-140.

14. Smelov V, Morre SA, de Vries HJ: Are serological chlamydia-specific markers useful to detect asymptomatic cases of lymphogranuloma venereum proctitis? *Sex Transm Infect* 2008, 84:77-78.

15. Koedijk FD, de Boer I, de Vries HJ, Thiesbrummel HF, van der Sande MA: An ongoing outbreak of lymphogranuloma venereum in the Netherlands, 2006-2007. *Euro Surveill* 2007, 12: E070419

16. Svenstrup, H.F., et al., Mycoplasma genitalium, Chlamydia trachomatis, and tubal factor infertility--a prospective study. *Fertil Steril* 2008, 90:513-20.

17. Idahl A., Boman J., Kumlin U. and Olofsson J.I. Demonstration of Chlamydia trachomatis IgG antibodies in the male partner of the infertile couple is correlated with a reduced likelihood of achieving pregnancy. *Human Reproduction* 2004, Vol.19, No.5

pp. 1121-26

18. Idahl A. Chlamydia trachomatis as a risk factor for infertility in women and men, and ovarian tumor developmen, Umeå, Sweden, 2009, pp.1-74

19. Perquin DA, Beersma MF, de Craen AJ, Helmerhorst FM. The value of Chlamydia trachomatis specific IgG antibody testing and hysterosalpingography for predicting tubal pathology and occurrence of pregnancy. Fertil Steril 2007; 88:224-226.

20. Hakim E, Epee M, Draycott T, Gordon UD, Akande VA. Significance of positive Chlamydia serology in women with normal-looking Fallopian tubes. Reprod Biomed Online 2009; 19:847-851.

21. Broeze KA, Opmeer BC, Coppus SF, van Geloven N, Alves MF, Anestad G, Bhattacharya S, Allen J, Guerra-Infante MF, den Hartog JE et al. Chlamydia antibody testing and diagnosing tubal pathology in subfertile women: an individual patient data meta-analysis. Hum Reprod Update 2011; 17:301-310.

22. Ray K. Chlamydia trachomatis & infertility. Indian J Med Res 123, June 2006, pp 730-734 55.

23. Horner P, Soldan K, Vieira SM, Wills GS, Woodhall SC, et al. C. trachomatis pgp3 Antibody Prevalence in Young Women in England, August 21, 2013 Editor: Caroline L. Trotter, University of Cambridge, United Kingdom.

24. US Preventative Task Force Screening for chlamydia infection. 28 June 2013. Available: <http://www.uspreventiveservicestaskforce.org/uspstf/uspshlm.htm>.

25. House of Commons Committee of Public Accounts (2013) Young people's sexual health: the National Chlamydia Screening Programme. 28 June 2013. <http://www.publications.parliament.uk/pa/cm200910/cmselect/cmpublicacc/283>

26. Немченко О.И. Урогенитальный хламидиоз, Дерматология 2007, №2, С.28-37.

27. Кухтинова Н. В., Кротов С. А., Кротова В. А. Рецидивирующие и хронические формы хламидофилеза у детей: современные стандарты диагностики, клинические особенности, схемы семейной реабилитации. Пособие для врачей. Кольцово. 2004., стр. 85

28. Сельков С. А. Методические проблемы диагностики урогенитального хламидиоза, Terra Medica. 2001, Т. 1, стр. 42–45.

29. Кубанова А.А. и др. Современные подходы к диагностике и терапии латентной хламидийной инфекции урогенитального тракта. Вестник

дерматологии и венерологии. 2004, №3, стр. 6-10.

30. Пашко Ю.П., Зигангирова Н.А., Капотина Л.Н., Моргунова Е.Ю., Колкова Н.И., Диденко Л. В. Особенности распространения в организме *Chlamydia trachomatis* при хроническом течении урогенитального хламидиоза и детекция возбудителя в сыворотке крови. Фундументальные исследования 2010, №7, С. 50-57

31. Исаков В. А., Куляшова Л. Б., Березина Л. А., Нуралова И. В., Гончаров С. Б., Ермоленко Д. К. Патогенез, диагностика и терапия урогенитального хламидиоза. Руководство для врачей. СПб 2010, С. 33-36

32. Ткаченко С.Б., Савичева А. М., Шипицына Е.В., и др. Быстрые простые методы в диагностике TORCH-комплекса. Практическое руководство для врачей, Москва 2006, С. 28-40.

33. Михайличенко В. В., Бойцов А.Г., Есипов А.С. Клиническая интерпретация результатов лабораторного обследования пациентов с урогенитальным хламидиозом. Terra Medica nova 2000, №4, С. 6-10.

34. Black CM. Serological tests for *Chlamydia trachomatis* infections (Author's Reply). Clin Microbiol Rev Jan. 1998; 11 (1): 228-9.

35. Руководство по лабораторной диагностике инфекций урогенитального тракта Разработано и одобрено Восточно - Европейской Ассоциацией по Сексуальному и Репродуктивному Здоровью. Под редакцией Домейки Марюса, Савичевой Алевтины, Соколовского Евгения, Балларда Рона, Унемо Магнуса, Санкт-Петербург, 2012, С. 5-25

36. Ведение больных инфекциями, передаваемыми половым путём, и урогенитальными инфекциями: клинические рекомендации Российского общества дерматовенерологов и косметологов. М.: Издательский дом «Деловой экспресс». 2012. С. 90-97.

37. Протокол ведения больных. «Инфекции, передаваемые половым путем». «Урогенитальная хламидийная инфекция». Под ред. В. И. Кисиной. М.: Ньюдиамед 2011, С. 164–191

38. 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 immunosorbent assay. Jpn J Infect Dis. 2007 Nov; 60 (6):347-51.

39. Verkooyen RP, Peeters MF, van Rijsoort-Vos JH, van der Meijden WI and Mouton JW. Sensitivity and specificity of three new commercially available *Chlamydia*

trachomatis tests. Internatl. J. STD AIDS 2002; 13 Suppl 2:23-25

40. Манзенюк И.Н., Воробьева М.С., Никитюк Н.М., Васильев М.М. Иммуноферментный анализ в серодиагностике инфекций, вызываемых *S.trachomatis*. Вестник Дерматологии и венерологии 2004, № 1, С. 23–236.

41. Дробченко С.Н., Савичева А.М., Шипицына Е.В., Шалепо К.В., Ткаченко С.Б. Новая медицинская технология в диагностике TORCH-комплекса. Журнал акушерства и женских болезней. Т. LVII. СПб 2007, С. 82.

42. Дробченко С.Н., Ткаченко С.Б., Савичева А.М., Быстрые простые методы в диагностике TORCH-инфекций., "Урогенитальные инфекции и репродуктивное здоровье: клиничко-лабораторная диагностика и терапия". Материалы 3-й Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции, СПб 2010, С. 32-36.

43. Дробченко С.Н., Савичева А. М., Шипицына Е.В., Шалепо К.В, Ткаченко С.Б., Новая медицинская технология диагностики TORCH- комплекса. Журнал акушерства и женских болезней 2011, том LX, С. 34.

44. Дробченко С.Н., Ривец Б., Сэмюэльс Ф., Бесприборные тесты для диагностики ВИЧ-инфекции, Журнал лабораторная диагностика 2010, №3-4, С. 29-31.

45. Дробченко С.Н., Савичева А. М., Шипицына Е.В., Шалепо К.В, Ткаченко С.Б., Новая медицинская технология диагностики TORCH-комплекса. Журнал лабораторная диагностика 2010, №3-4, С.26-29.

46. Ришук С.В, Костючек Д.Ф Значение специфических лабораторных тестов при хронизации хламидийной инфекции. II Всероссийский конгресс дерматовенерологов: тезисы научных работ. - СПб, 2007.- С. 162-163.

47. Ришук С.В., Дробченко С.Н. Лабораторные маркёры урогенитальной хламидийной инфекции при различных вариантах клинических проявлений у женщин и мужчин, Материалы региональной научно-практической конференции с международным участием «Инновационные технологии в диагностике и лечении кожных заболеваний и инфекций урогенитального тракта», Гродно, ГрГМУ, 2012, стр. 107-114.

48. Ришук С.В., Дробченко, Сопоставление лабораторных показателей, клинических проявлений и осложнений хламидийной инфекции, Материалы 5-й Междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Урогенитальные инфекции и репродуктивное здоровье: клиничко-



лабораторная диагностика и терапия», TERRA MEDICA NOVA (Приложение), 2012, №1, стр. 77-80

49. Рищук С.В. Клинико-лабораторные аспекты хронических воспалительных заболеваний и дисбиозов у половых партнёров: Автореферат диссертации доктора мед. наук. – Санкт-Петербург, 2006. – 400 с.

50. Михнина Е. А., Давыдова Н.И., Эллиниди А.Н., Дрыгина Л.Б. Показатели системного иммунного ответа у женщин с хроническим сальпингофоритом хламидийной и нехламидийной этиологии. Акушерство и женские болезни 2012, выпуск 1,

50. Freidank M. H., Holtje M. et al. Prevalence of antibodies to Chlamydia pneumoniae and Chlamydia trachomatis in different populations. Abstracts of Proceedings of the 3rd Meeting of the European Society for Chlamydial Research. Vienna, Austria. 11-14 September 1996, 376.

51. La Rue R.W., B.D. Dill, D.K. Giels, J.D. Whittimore et al. Chlamydial Hsp60-2 is iron responsive in Chlamydia trachomatis serovar E-infected human endometrial epithelial cells in vitro. Infect. Immun. 2007, V 75, 5: 2374–80.

52. Kinnunen A. , H.M. Surcel, M. Halttunen et al. Chlamydia trachomatis heat shock protein 60 induced interferon-gamma and interleukin 10 production in infertile women. Clin. Exp. Immunol 2003, 131: 299–303.

53. Wills GS, Horner PJ, Reynolds R, et al. Pgp3 antibody enzyme-linked immunosorbent assay, a sensitive and specific assay for seroepidemiological analysis of Chlamydia trachomatis infection. Clin. Vaccine Immunol. 2009; 16:835-843.

54. Idahl A., Abramsson L., Kumlin U., Liljeqvist J. A., Olofsson J. I. Male serum Chlamydia trachomatis IgA and IgG, but not heat shock protein 60 IgG, correlates to negatively affected semen characteristics and lower pregnancy rates in the infertile couple. International Journal of Andrology 2007 30:99-107

55. Dadamessi I, Eb F, Betsou F. Combined detection of Chlamydia trachomatis -specific antibodies against the 10 and 60-kDa heat shock proteins as a diagnostic tool for tubal factor infertility: Results from a case-control study in Cameroon. FEMS Immunol Med Microbiol 2005; 45: 31-5.

### **Иммунный ответ при хламидийной инфекции**

При хламидийной инфекции происходят изменения как клеточного, так и гуморального звеньев иммунитета. В настоящее время доказано, что при хламидиозе начинают развиваться следующие защитные иммунологические

реакции:

- локальное образование секреторных s-IgA;
- цитотоксическая защита посредством Т-лимфоцитов;
- образование антител классов IgM, IgA, IgG к хламидийному липополисахаридному антигену.

Последовательная динамика появления различных классов антител IgM, IgA, IgG позволяет поставить точный серологический диагноз хламидийной инфекции.

Наработка антител к антигенам хламидий происходит на стадии элементарных телец, когда хламидийные клетки находятся в межклеточном пространстве и доступны для контакта с иммунокомпетентными клетками организма. Хламидии поглощаются периферическими моноцитами, распространяются и оседают в различных органах и тканях организма человека, сохраняясь там в течение длительного периода времени, что, как правило, приводит к развитию восходящей персистирующей формы инфекции, которая обуславливает хроническое течение болезни. При этом время от времени происходит высвобождение антигенов хламидий из клеток, что приводит к индуцированию гуморального ответа. Известно, что возбудитель или его антигенные или нуклеиновые компоненты могут не выявляться в воротах первоначальной инфекции. Заболевание приобретает системный характер.

Сами хламидии - слабые иммуногены, поэтому титры антител при хламидиозах относительно не высоки. О сроках появления антител к основным белкам хламидий известно пока очень мало. В промежутке между 1-3 неделями после проявления первых симптомов болезни последовательно возникают родоспецифические антитела M, A, G, а в ряде случаев их удается определить вместе в этот период.

IgM антитела в сыворотке пациентов являются ранним маркером инфекции, появляются первыми при иммунологическом ответе макроорганизма, инфицированного хламидиями. Наличие специфических IgM свидетельствует о развитии острой фазы хламидийной инфекции. Основное количество IgM сосредоточено в сосудистом русле. Период полураспада составляет 5 дней. IgM оказывают стимулирующее влияние на синтез IgG. Антитела IgM определяются уже через 5 дней после начала заболевания. Они нарабатываются против специфического хламидийного липополисахарида как наиболее сильного антигенного раздражителя иммунной системы, обладающего

родоспецифическими функциями, стимулирующего антителогенез уже на ранней стадии инфицирования организма человека. Пик IgM приходится на 1-2 неделю. Затем происходит снижение титра антител. Как правило, IgM полностью исчезают через 2-3 месяца независимо от проведенного лечения. Эти антитела присутствуют только при острой фазе заболевания и не определяются при реинфекции. Их отсутствие не исключает наличие протекающей инфекции, особенно при ее обострении на фоне хронизации инфекционного процесса или при реинфицировании. Антитела данного класса в ряде случаев могут не выявляться у подростков и взрослых при острой реинфекции (предыдущее инфицирование *C.trachomatis* или другими видами хламидий (*C.pneumonia*)).

В практическом здравоохранении определение IgM антител к *C.trachomatis* не имеет большого значения так как острая фаза заболевания лучше выявляется прямыми методами определения возбудителя.

IgA существуют в сывороточной и секреторной формах. В сыворотке антитела появляются через 10-14 дней после начала заболевания, обычно параллельно появлению IgG, только на более низком уровне титров и свидетельствуют о прогрессировании заболевания. Первая защитная реакция организма на инфекцию состоит в индукции секреторного IgA в местах проникновения инфекции. Вначале этот класс антител можно детектировать в семенной и вагинальной жидкостях, в то же время отсутствует корреляция с содержанием сывороточного IgA. Уровень IgA антител обычно снижается к 2-4 месяцу в результате успешного лечения. При реинфекциях уровень IgA вновь возрастает.

Если уровень IgA не падает после проведенного лечения, то это указывает на неэффективность лечения и формирование хронической формы 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. Наличие IgA свидетельствует об активации хламидийной инфекции. Однако в течение короткого периода могут быть параллельно представлены IgM и IgA антитела. В это же время или с небольшой задержкой могут быть определены антитела класса IgG.

Определение специфических IgA более информативно в качестве маркера активной стадии хламидийной инфекции или в мониторинге эффективности лечения, так как эти антитела короткоживущие (5-8 дней) и имеют небольшой период полураспада.

IgG - доминирующий класс иммуноглобулинов в сыворотке крови,

составляющий до 90% всех антител. Около 48% его количества находится вне кровеносного русла, проходит через плацентарный барьер. Период полураспада - 23 дня. Аффинитет IgG к антигенным детерминантам хламидий повышается по мере развития иммунного ответа. IgG антитела определяются через 15-20 дней после начала заболевания. Их наличие отражает более 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 если происходит реинфекция или реактивация, наблюдается заметное увеличение уровня IgG, который у нелеченых пациентов сохраняется на неизменном уровне. Высокие уровни антихламидийных IgG диагностически важны при хронических или системных инфекциях: сальпингиты, механическая инфертильность, перигепатиты, эпидимиты, синдром Рейтера и пневмонии.

Наличие IgG антител, при отсутствии IgM и IgA к *C.trachomatis* у новорожденного свидетельствует, что не было внутриутробной инфекции. Материнские IgG антитела передаются плоду уже с 12-16 недели, тогда как материнские IgM и IgA антитела не проникают через плаценту. Пассивные IgG антитела исчезают у ребенка в течение 6-10 месяцев после рождения. В тех случаях, когда произошло внутриутробное инфицирование, у зараженного плода, наряду с появлением материнских IgG антител, на 16-24 неделях развития начинают вырабатываться собственные вирусспецифические IgM и IgA антитела, которые могут персистировать у ребенка в течение длительного времени после рождения - до 6 месяцев, а в отдельных случаях до года и дольше. Количество IgG в сыворотке крови после рождения обычно достигает уровня взрослого организма в течение первого года жизни, уровень IgM – к возрасту 4 лет, а IgA – в подростковом периоде [25]. Поэтому наличие антихламидийных антител у ребенка, титры которых имеют тенденцию к снижению, указывает на их анамнестический характер (пассивная передача антител от матери). Отсутствие у новорожденного ребенка антихламидийных антител не означает отсутствия хламидиоза и требует проведения микробиологического и повторного серологического методов обследования и наблюдения.

Хроническое течение хламидийной инфекции позволяет диагностировать в крови пациентов IgA и IgG антитела, уровни которых меняются незначительно в противоположность острой инфекции. Иногда, при таком течении инфекции в течение 1-2 недель могут регистрироваться единичные Ig A при не детектируемом уровне IgG. 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 Ig A и IgG может обеспечивать контроль излеченности пациентов [32]. Выявление 2-3 кратного снижения уровня A и/или G антител при исследовании в парных сыворотках может свидетельствовать об успешно проведенной терапии. Использование в серодиагностике парных сывороток, полученных на разных стадиях инфекции может быть полезным, так как 2-4-кратная сероконверсия, т.е. увеличение титра антител во второй сыворотке по сравнению с первоначальной, свидетельствует об активной инфекции.