

ДП „Науково-технічний центр імунобіотехнології  
НТК „Інститут монокристалів” НАНУ  
Науково-виробнича компанія “Діапроф-Мед”

## **ПРАКТИЧНИЙ ПОСІБНИК**

**по роботі**

**з імуноферментною тест-системою**

**для визначення протихламідійних антитіл  
(DIA-Chlamydia)**

Київ - 2004

УДК 616.98-07:578.826.6

ПРАКТИЧНИЙ ПОСІБНИК по роботі з імуноферментною тест-системою для визначення протихламідійних антитіл (DIA-Chlamydia)<sup>4</sup>

Під редакцією професора М.Я. Співака

Автори: Іванська Н.В., Руденко А.В.,  
Кругліков В.Т., Раєвська Г.С., Кас'яненко Т.В.,  
Мізецька Т.І., Шеховцов В.О.

Зміст

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| Скорочення, використані у тексті посібника                    | 3  |
| Вступ                                                         | 4  |
| Класифікація та біологічні властивості хламідій               | 7  |
| Антигенний склад хламідій                                     | 10 |
| Методи лабораторної діагностики                               | 12 |
| Специфічні антитіла при хламідійній інфекції                  | 16 |
| Методика проведення ІФА на тест-системі „DIA-Chlamydia”       | 20 |
| Характеристика показників якості тест-системи „DIA-Chlamydia” | 30 |
| Література                                                    | 33 |

Київ, “Діапроф-Мед”, 2004

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

Скорочення, використані у тексті посібника:

- АГ-антиген;  
 АТ – антитіло;  
 ВЛГ – венерична лімфогранульома;  
 ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я;  
 ГЗ – граничне значення (оптичної густини);  
 ДЕАЕ-декстран – діетиламіноетилдекстран;  
 ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;  
 ЕТ – елементарні тільця (хламідій);  
 ІФА – імуноферментний аналіз;  
 ІТ – ініціальні тільця (хламідій);  
 ЛПС – ліпополісахарид;  
 МКА – моноклональні антитіла;  
 ММ – молекулярна маса;  
 МОЗ – Міністерство охорони здоров'я;  
 ОБЗМ – основний білок зовнішньої мембрани хламідій (= МOMP);  
 ОГ – оптична густина;  
 ОГ<sub>сер</sub> К<sup>-</sup> – середнє значення оптичної густини для проб негативного контролю;  
 ОГ<sub>сер</sub> ІgG К<sup>+</sup> та ОГ<sub>сер</sub> ІgА К<sup>+</sup> – середнє значення оптичної густини для проб позитивного контролю;  
 о.о. – оптична одиниця;  
 ПЕГ – поліетиленгліколь;  
 ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;  
 РЗК – реакція зв'язування комплекменту;  
 РІФ – реакція імунофлуоресценції;  
 РНІФ – реакція непрямой імунофлуоресценції;  
 РНК – рибонуклеїнова кислота;  
 РПІФ – реакція прямої імунофлуоресценції;  
 РТ – ретикулярні тільця (хламідій);  
 ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;  
 CDC (U.S.A. Centers for Disease Control and Prevention) – Центри США з проблем контролю та попередженню захворювань;  
 CV – коефіцієнт варіації;  
 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – твердофазний імуноферментний аналіз;

FDA (USA Food and Drug Administration) – Агенція США з питань продовольства та медикаментів;

IgA – імуноглобуліни класу А;

IgG – імуноглобуліни класу G;

IgM – імуноглобуліни класу M;

МOMP (major outer membrane protein) – основний білок зовнішньої мембрани хламідій;

### Література

1. Крогов С.А., Крогова В.А., Юрьев С.Ю. Хламидиозы: эпидемиология, характеристика возбудителя, методы лабораторной диагностики, лечение генитального хламидиоза. – Реф. сообщение. – Кольцово, 1997, 63 с.
2. Бочкарев Е.Г., Ю.В.Сергеев, М.А.Башмакова и др. Хламидиоз: современные подходы к диагностике и лечению (пособие для врачей). – 2002. – <http://www.ias1.ru/b/cover.htm>
3. Мавров И.И. Хламидийные инфекции урогенитального тракта. – В кн.: «Венерические болезни». – М.: «Медицина». – 1991. – С.390-412.
4. Гранитов В.М. Хламидиозы. – М.: «Медицинская книга», Н.Новгород: Издательство НГМА. – 2002. –192 с.
5. Кудрявцева Л.В., Мисторина О.Ю., Генерозов Э.В. и др. Клиника, диагностика и лечение хламидийной инфекции (пособие для врачей). Москва, 2001. – 40 с. - <http://www.lytech.ru/Main/methchlamyid.htm>
6. Standberry L.R., Bernstein D.I. Sexually Transmitted Diseases: Vaccines, Prevention and Control. – Academic Press. – San-Diego – New-York – San-Francisco – Boston – London – Sydney – Tokyo. – 2000. – 468 pp.
7. Black C.M. Current methods of laboratory diagnostics of Chlamydia trachomatis infection. – In the “Clinical Microbiology Reviews”. – 1997. – pp. 160-184.
8. Бочкарев Е.Г. Лабораторная диагностика хламидийной инфекции. – 2002. – 38 с. <http://www.nature.ru/db/msg.html?mid>
9. Скрипкин Ю.К., Кубанова А.А., Дмитриев Г.А. и др. Современные подходы к диагностике хламидиоза. - Вестн.дерматол.венерол.- 1996. - № 4. - 26-28.
10. Шагун
11. Barnes R.C. Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. Clin. Microbiol.Revs, April 1989, p. 119-136.
12. Манзенюк И.Н., Воробьева М.С. Chlamydia trachomatis. Сообщение 1. Современные представления о возбудителе. Серодиагностика. – Новосибирск: Информационные материалы ЗАО «Медико-биологический союз», 2003, 26 с.

## Вступ

Таблиця 7 - Результати контролю тест-системи "DIA-Chlamydia" на стандартній панелі сироваток, які містять та не містять специфічні антитіла класу IgG до *Ch. trachomatis*

| № зразка | IgG   |       |                 |
|----------|-------|-------|-----------------|
|          | ОГ    | ОГ/ІЗ | Титр антитіл    |
| 1        | 0,031 | 0,23  | Негативна       |
| 2        | 0,073 | 0,56  | Негативна       |
| 3        | 0,03  | 0,23  | Негативна       |
| 4        | 0,089 | 0,68  | Негативна       |
| 5        | 0,024 | 0,18  | Негативна       |
| 6        | 0,015 | 0,11  | Негативна       |
| 7        | 0,017 | 0,13  | Негативна       |
| 8        | 0,016 | 0,12  | Негативна       |
| 9        | 0,032 | 0,24  | Негативна       |
| 10       | 0,021 | 0,16  | Негативна       |
| 11       | 0,016 | 0,12  | Негативна       |
| 12       | 0,009 | 0,06  | Негативна       |
| 13       | 0,082 | 0,62  | Негативна       |
| 14       | 0,018 | 0,14  | Негативна       |
| 15       | 0,017 | 0,13  | Негативна       |
| 16       | 0,102 | 0,78  | Негативна       |
| 17       | 0,043 | 0,33  | Негативна       |
| 18       | 0,018 | 0,14  | Негативна       |
| 19       | 0,012 | 0,09  | Негативна       |
| 20       | 0,015 | 0,11  | Негативна       |
| 21       | 0,735 | 5,6   | Позитивна 1:40  |
| 22       | 2,722 | 20,7  | Позитивна >1:80 |
| 23       | 1,987 | 15,6  | Позитивна >1:80 |
| 24       | 2,357 | 18,9  | Позитивна >1:80 |
| 25       | 3,12  | 23,8  | Позитивна >1:80 |
| 26       | 3,011 | 23,0  | Позитивна >1:80 |
| 27       | 0,796 | 6,1   | Позитивна 1:40  |
| 28       | 2,755 | 21,0  | Позитивна >1:80 |
| 29       | 0,517 | 3,9   | Позитивна 1:20  |
| 30       | 0,31  | 2,4   | Позитивна 1:20  |
| 31       | 1,269 | 9,7   | Позитивна 1:40  |
| 32       | 0,642 | 4,9   | Позитивна 1:20  |
| 33       | 0,208 | 1,6   | Позитивна 1:10  |
| 34       | 1,928 | 13,9  | Позитивна >1:80 |
| 35       | 0,764 | 5,8   | Позитивна 1:40  |
| 36       | 0,687 | 5,2   | Позитивна 1:40  |

Останнім часом хламідійна інфекція як збудник захворювань у дорослих та дітей все частіше притягує увагу фахівців різного профілю. Удосконалення методів діагностики дозволяє по-новому оцінити роль хламідій у патологічних процесах.

Співіснуючи протягом тисячоліть з різноманітними хазяями, хламідії набули дієвих засобів збереження своєї популяції та забезпечили собі широку циркуляцію в природі; їх виявлено приблизно у 200 видів теплокровних, включаючи й людину, а також у риб, амфібій, молосків та членистоногих.

Хламідії – причина багатьох хвороб різноманітної локалізації. Самі лише біовари А, В і С *Chlamydia trachomatis* викликають щорічно інфікування 500 млн чол., приблизно в 400 млн з них розвивається трахома, а до 7 млн. чол. сліпнуть [1,2]. Взаємодіючи з іншими біотичними та абіотичними чинниками, особливо при асоціаціях з різними мікроорганізмами, хламідії нерідко відповідають і за летальні випадки захворювань.

За даними експертів ВООЗ, серед хвороб, що передаються при статевих стосунках, хламідійна інфекція посідає за поширеністю друге місце [2, 3]. Численні хвороби, викликані хламідіями, передаються найчастіше не при побутових контактах, а саме статевим шляхом. Щороку в світі реєструють 89 млн нових випадків урогенітального хламідіозу, причому майже всі вони припадають на вікові групи населення з найвищою сексуальною активністю. Один з найсерйозніших наслідків хламідіозу – порушення репродуктивної функції. Через інфікованість статеві сфери дорослих хламідійна інфекція стає захворюванням немовлят у період після пологів; у цьому випадку вона відрізняється великим розмаїттям (“нехарактерністю”) клінічних симптомів та потребує ретельної лабораторної діагностики.

Різноманітні хламідійні інфекції людини, наприклад, трахома, кон'юнктивіти, пситакоз, хламідійна пневмонія та венерична лімфогранульома (ВЛГ), відомі дуже давно. Для сучасної епідеміології найбільше значення має *Ch. trachomatis*. Цей збудник викликає численні урогенітальні захворювання (“неспецифічні” уретрити, епідидиміти, простатити, цервіцити),

ВЛГ, ендемічну трахому, синдром Рейтера; запальні процеси в органах малого тазу призводять до несправжньої вагітності, неплідності, передчасних пологів та народження мертвих дітей в інфікованих жінок; хламідіози – винуватці імпотенції та неплідності в чоловіків; у новонароджених немовлят хламідії спричиняють пневмонії та кон'юнктивіти [2, 4,5].

Точно оцінити поширеність *Ch. trachomatis* як причини запальних процесів малого тазу важко через непомітний (безсимптомний та субклінічний) перебіг інфекції більш як у 70 % інфікованих жінок. Найчастіше найпершою ознакою зараженості стає неплідність. Проведені дослідження доводять, що 20-40 % жінок дітородного віку контактували зі збудником, бо у крові їх виявлено антитіла проти *Ch. trachomatis* [4, 6].

Особливості біології хламідій проявляються в здатності їх до персистенції, частому формуванні хронічних форм захворювання; значна роль належить хламідіям у патології вагітних жінок, плоду та новонароджених дітей; тому хламідіози відносять до категорії важливих медико-соціальних проблем.

В Україні хламідійні інфекції становлять серйозну проблему. Відсутність реєстрації та належної лабораторної діагностики хламідіозів не дають поки що змоги точно визначити їх частоту в нашій країні. Проте за даними Українського НДІ дерматології та венерології МОЗ України, захворюваність на урогенітальний хламідіоз та уреоплазмоз у країні в декілька разів перевищує захворюваність на гонорею та інші венеричні хвороби.

Згідно з указом Президента України № 203/2001 від 26.03.2001 р., в Україні створено Національну програму “Репродуктивне здоров'я 2001-2005”, що направлена на поліпшення демографічної ситуації в державі, збереження репродуктивного здоров'я населення, охорони материнства й дитинства та зміцнення сім'ї. Основні завдання Програми – це, зокрема, поліпшення якості та доступності медичної допомоги, що надається з метою охорони репродуктивного здоров'я; здійснення заходів щодо профілактики захворювань, які передаються статевим шляхом.

Для діагностики хламідійної інфекції науково-виробнича компанія “Діапроф-Мед” випускає імуноферментну тест-

Таблиця 6 - Результати контролю тест-системи “DIA-Chlamydia” на стандартній панелі сироваток, які містять та не містять специфічні антитіла класу IgA до *Ch. trachomatis*

| № зразка | IgA   |       |                | Сироватка |
|----------|-------|-------|----------------|-----------|
|          | ОГ    | ОГ/ГЗ | Титр антитіл * |           |
| 1        | 0,024 | 0,18  | -              | Негативна |
| 2        | 0,012 | 0,09  | -              | Негативна |
| 3        | 0,018 | 0,14  | -              | Негативна |
| 4        | 0,019 | 0,15  | -              | Негативна |
| 5        | 0,038 | 0,29  | -              | Негативна |
| 6        | 0,052 | 0,4   | -              | Негативна |
| 7        | 0,013 | 0,1   | -              | Негативна |
| 8        | 0,032 | 0,25  | -              | Негативна |
| 9        | 0,044 | 0,34  | -              | Негативна |
| 10       | 0,018 | 0,14  | -              | Негативна |
| 11       | 0,019 | 0,15  | -              | Негативна |
| 12       | 0,007 | 0,05  | -              | Негативна |
| 13       | 0,021 | 0,16  | -              | Негативна |
| 14       | 0,022 | 0,17  | -              | Негативна |
| 15       | 0,06  | 0,46  | -              | Негативна |
| 16       | 0,018 | 0,14  | -              | Негативна |
| 17       | 0,058 | 0,45  | -              | Негативна |
| 18       | 0,025 | 0,19  | -              | Негативна |
| 19       | 0,242 | 1,86  | 1:10           | Позитивна |
| 20       | 0,384 | 2,9   | 1:20           | Позитивна |
| 21       | 1,29  | 10,0  | 1:80           | Позитивна |
| 22       | 0,447 | 3,5   | 1:20           | Позитивна |
| 23       | 0,732 | 5,7   | 1:40           | Позитивна |
| 24       | 0,356 | 2,6   | 1:20           | Позитивна |
| 25       | 0,388 | 3,1   | 1:20           | Позитивна |
| 26       | 2,384 | 18,4  | >1:80          | Позитивна |
| 27       | 0,502 | 3,9   | 1:40           | Позитивна |
| 28       | 0,507 | 3,9   | 1:40           | Позитивна |
| 29       | 0,418 | 3,2   | 1:20           | Позитивна |
| 30       | 0,225 | 1,7   | 1:10           | Позитивна |

відомому явищу трансформації чи плазмідному переносові ДНК (горизонтальна міжвидова передача інформації), що викликає антигенну мімікрію – уподібнення окремих структур достатньо віддалених видів.

Серологічний тест не можна використовувати для постановки остаточного діагнозу. Необхідно взяти до уваги клінічну картину та інші дані лабораторних досліджень.

#### Характеристика показників якості тест-системи “DIA-Chlamydia”

Чутливість та специфічність тест-системи “DIA-Chlamydia” визначали на стандартних панелях охарактеризованих сироваток, які містять та не містять специфічні антитіла класів IgA та IgG до *Ch. trachomatis*. Панелі вироблені Державним науково-дослідним інститутом стандартизації та контролю медичних біологічних препаратів ім. Л.А.Тарасевича (Росія).

Стандартна панель сироваток, які містять та не містять специфічні антитіла класу IgA до *Ch. trachomatis* складається з 30 сироваток:

- 18 негативних зразків (ОГ/ГЗ < 1);
- 12 позитивних - з різним рівнем протихламідійних антитіл: високотитражні (ОГ/ГЗ  $\geq$  8) – 2 зразки; низькотитражні (ОГ/ГЗ від 1,1 до 2,0) – 2 зразки; середньотитражні (ОГ/ГЗ від 2,1 до 8) – 8 зразків.

Стандартна панель сироваток, які містять та не містять специфічні антитіла класу IgG до *Ch. trachomatis*, складається з 38 сироваток:

- 20 негативних зразків (ОГ/ГЗ < 1);
- 16 позитивних - з різним рівнем протихламідійних антитіл: високотитражні (ОГ/ГЗ  $\geq$  8) – 7 зразків; середньотитражні (ОГ/ГЗ від 2,1 до 7,9) – 8 зразків; низькотитражні (ОГ/ГЗ від 1,1 до 2,0) – 1 зразок.

Результати контролю тест-системи “DIA-Chlamydia” приведені в таблицях 6 і 7.

систему “DIA-Chlamydia” для виявлення імуноглобулінів класу G і/або класу А людини до *Chlamydia trachomatis*.

#### Класифікація та біологічні властивості хламідій

Хламідії – це патогенні грамнегативні бактерії; всі види хламідій – своєрідні анаеробні «енергетичні» паразити різноманітних клітин-хазяїв; у них виявлено унікальний цикл внутрішньоклітинного розвитку та загальний родоспецифічний антиген [6, 7, 8].

Протягом останніх років класифікацію хламідій переглядали та уточнювали на основі нових відомих подробиць будови, розвитку та даних молекулярної біології. Згідно з сучасними підходами геносистематики, класифікація хламідій та хламідієподібних мікроорганізмів базується на гомології їхніх геномних ДНК та нуклеотидних послідовностей 16S- та 23S-рРНК. Завдяки цьому у межах класу *Chlamydiales* було класифіковано ряд хламідієподібних організмів та змінено родову назву деяких збудників, яких раніше зараховували до роду *Chlamydia*. Нині до цього роду включають лише давно відомий та дуже важливий з епідеміологічного погляду (через ставеву передачу від людини до людини) вид *Ch. trachomatis* та два нових – *Ch.suis* і *Ch.tyridarum*; інших, теж дуже важливих з медичного погляду представників родини *Chlamydiaceae* віднесено тепер до роду *Chlamydiaophila*; це, зокрема, *Ch.pneumoniae*, *Ch.psittaci*<sup>2</sup> та *Ch.pescorum* [5]. Не зупиняючись детальніше на систематичі хламідійних збудників, що викликають захворювання в різних тварин, вкажемо лише, що, мабуть, чи не всі вони передаються від тварин людині та причетні до виникнення певних хвороб людини, хоча питання

<sup>1</sup> Створюється враження, що його варт називати, в зв'язку з новою класифікацією, принаймні родоспецифічним антигеном, бо він присутній і у представників роду *Chlamydia*, і у представників роду *Chlamydiaophila* родини *Chlamydiaceae*.

<sup>2</sup> За новою класифікацією *Ch.psittaci* містить тепер лише штами, що викликають захворювання птахів та можуть, передаючись людині, викликати захворювання на пситакоз.

про їхню патологічну роль для людини лише починає вирішуватися.

На відміну від вірусів, хламідії містять дві нуклеїнові кислоти – і ДНК, і РНК<sup>3</sup>; паразити локалізуються у цитоплазматичних вакуолях клітини, не вступуючи в безпосередній контакт з клітинним геномом. Для хламідій характерна відсутність “прихованого” періоду (так званої лаг-фази репродукції); їх знаходять у клітині протягом усього періоду паразитування. Маючи власну ДНК-залежну РНК-полімеразу, ряд ферментів катаболізму глюкози та деякі ферменти, необхідні для дихання, хламідії позбавлені цитохрому, а тому не здатні створювати й використовувати макроенергетичних сполук і щодо багатьох метаболітів цілковито залежать від клітини-хазяїна.

Інші особливості хламідій – схильність до переживання у латентному стані й до тривалого перебування в клітинах інфікованих організмів; збереження інфекційності сприяє широкій передачі збудника в межах виду, а також його міжвидовій передачі.

У залежності від стадії розвитку хламідії існують у різних морфологічних формах. Головний компонент чистої популяції хламідій – елементарні тільця (ЕТ) сферичної або овальної форми, діаметром 200–400 нм, оточені двома трьохшаровими мембранами. ЕТ складаються з двох компонентів – ексцентрично розміщеного аналогу ядра (нуклеоїда) у формі овалу чи півмісяця, який прилягає до цитоплазматичної мембрани, і дифузної розподіленого та менш щільно вкладеного гранульованого матеріалу – рибосом, що прилягають одна до одної. ЕТ інфекційні, дуже стійкі до несприятливих впливів у міжклітинному середовищі. Вони проникають всередину клітини шляхом фагоцитозу; у фагоцитарній вакуолі ЕТ

<sup>3</sup> Через їхній облігатний внутрішньоклітинний паразитизм збудників пситакозу, орнітозу та венеричної лімфогранульоми довго (до 1963 р.) вважали великими вірусами; пізніше цих паразитів, виявивши у складі їх як РНК, так і ДНК, зарахували до дрібних бактерій. Вміст ДНК у хламідіях складає 3–4 %, РНК - 2–7 %. Молекулярна маса ДНК становить 660 МДа, а довжина молекули ДНК - 342,5 мкм (кільцева молекула ДНК містить 6–8,5 млн. пар нуклеотидів).

## Інтерпретація результатів визначення IgG/IgA

Таблиця 5. Інтерпретація результатів ІФА

| Нааявність антитіл до <i>Ch.trachomatis</i> |                             | Інтерпретація результату                                  |
|---------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------------------|
| IgG                                         | IgA                         |                                                           |
| Негативний                                  | Негативний                  | Зразок негативний або містить надто низькі рівні антитіл* |
| Негативний                                  | Невизначений або позитивний | Можлива рання стадія інфекції*                            |
| Невизначений або позитивний                 | Негативний                  | Ознака перенесеної інфекції                               |
| Позитивний                                  | Позитивний                  | Гостра або хронічна інфекція                              |

Слід зауважити, що у випадку ранньої хламідійної інфекції результат ІФА може бути негативний через відсутність антитіл на початковому етапі хвороби. При наявності клінічних проявів захворювання рекомендують провести повторне тестування через 14-21 день. Чотирикратне підвищення рівня антитіл свідчить про загострення чи розвиток хвороби.

Звичайно антитіла проти хламідій знаходять у 55-65 % інфікованих осіб; не завжди наявність їх свідчить саме про хворобу, а не лише про контакт організму зі збудником. Крім того, антитіла можна виявляти у колишніх хворих ще протягом року після одужання.

Часом антитіл не виявляють через пригнічення імунної відповіді організму і, отже, дуже низького рівня антитіл.

За даними різних дослідників, частота хібно-позитивних реакцій на антихламідійні антитіла складає 2-5 % (Справочник СПБ по медичинській лабораторній діагностиці). Такі результати бувають обумовлені наявністю спільних епітопів у оболонкових (чи й внутрішніх) білків хламідій та деяких інших мікроорганізмів. Спільні гени чи ділянки генів можуть передаватися від одного виду бактерій до іншого завдяки



Результат кожного аналізу оцінюють наступним чином:

|           |                     |
|-----------|---------------------|
| > 10 DU   | <b>ПОЗИТИВНИЙ</b>   |
| 9 – 10 DU | <b>НЕВИЗНАЧЕНИЙ</b> |
| < 9       | <b>НЕГАТИВНИЙ*</b>  |

Наприклад, значення трьох лунок з негативним контролем:

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

- $OG_{сер} K = 0,020$
- $G3 = OG_{сер} K + 0,12 = 0,020 + 0,12 = 0,14$

- Якщо досліджувана сироватка має значення  $OG$  менше за 9 DU, наприклад,  $OG$  зразка = 0,056 о.о., згідно з формулою враховуємо:

$0,056 \times 10 : 0,14 = 4$  DU - така сироватка вважається негативною;

- Якщо досліджувана сироватка має значення  $OG$  в інтервалі між від 9 до 10 DU,

наприклад,  $OG$  зразка = 0,135 о.о.;

$0,135 \times 10 : 0,14 = 9,64$  DU - таку сироватку слід вважати невизначеною або сумнівною. Ця сироватка підлягає повторному аналізу в 2 лунках. Якщо вона і на цей раз буде сумнівною слід повторно взяти сироватку у пацієнта на аналіз через 2-3 тижні.

- Якщо досліджувана сироватка має значення  $OG$  більше 10 DU,

наприклад,  $OG$  зразка = 1,2 о.о.;

$1,2 \times 10 : 0,14 = 85,7$  DU - така сироватка вважається позитивною.

перетворюються на ретикулярні, або ініціальні тільця (РТ або ІТ), які, розмножуючись, утворюють у цитоплазмі тільця включення, названі тільцями Гальберштедера-Провачека [5,9]. Це вегетативна форма хламідій, що стає попередником нового покоління інфекційних ЕТ. Розміри РТ коливаються від 400-600 до 800-1000 нм, форма овальна чи округла; нерідко ЕТ поліморфні. РТ вкриті чітко вираженою трьошаровою зовнішньою оболонкою та внутрішньою мембраною. Їхня тонка внутрішня структура складається з більш-менш щільної ретикулогрануляційної матриці. У період накопичення хламідій в уражених тканинах виявляють лабільний антиген токсичної дії, переважно пов'язаний із ЕТ та подібний до ендотоксину.

Після декількох циклів ділення РТ через проміжні форми перетворюються на ЕТ нового покоління. Мікроколонії паразита розміщуються всередині цитоплазматичних пухирців (везикул), що розриваються на пізній стадії захворювання.

Отже, у ході розмноження хламідії проходять складний біологічний цикл трансформації від зрілих ЕТ через проміжні РТ та їхні ущільнені форми знову до ЕТ. Сполучення двох фаз – внутрішньоклітинного розвитку та виживання поза клітиною – становить життєвий цикл хламідій. Тривалість одного циклу розвитку хламідій всередині клітини залежить від штаму і становить 40-72 год. Вивільнені з клітини ЕТ проникають у нові клітини хазяїна, і там процес розпочинається з початку. За несприятливих умов розвитку він може проходити повільніше та тривати довше [5].

При безсимптомній інфекції ЕТ можуть вивільнюватися з клітини через вузький ободок цитоплазми, а клітина зберігає життєздатність.

Електронно-мікроскопічні дослідження доводять, що хламідії здатні тривалий час переживати у клітинах епітелію та фібробластах, у клітинах слизової оболонки. ЕТ паразита поглинаються периферичними моноцитами, розносяться по всьому організму. Осідаючи в тканинах, моноцити перетворюються на тканинні макрофаги та зберігають життєздатність протягом декількох місяців. Як антигенні стимулятори, такі макрофаги сприяють утворенню фіброзних гранулём у здорової тканині. Виходячи з клітин, хламідії чи уламки їх викликають утворення антитіл у враженому організмі.

### Антигенний склад хламідій

Хламідії, за даними електрофорезу, містять не менш як 40 різних пептидів. Тому їхня антигенна структура складна. Виявлено різноманітні антигени паразита, які мають видову, підвидову, родову та типову специфічність [10].

Клітинна стінка ЕТ хламідій містить три основних поліпептиди з молекулярними масами (ММ) 155, 40 та 29 кДа. Поліпептид 155 кДа – це видоспецифічний антиген. За носіїв родоспецифічної і типоспецифічної антигенної активності хламідій вважають поверхневі поліпептиди з ММ 60-62 кДа та ~ 40 кДа, відповідно.

Основний (мажорний) антигенний компонент зовнішньої мембрани (ОБЗМ, основний білок зовнішньої мембрани, або МОМР, major outer membrane protein), характерний для ЕТ та РТ протягом всього циклу розвитку хламідій, принаймні, представників родів *Chlamydia* та *Chlamydia* – це так званий родоспецифічний антиген<sup>4</sup>. Він являє собою ліпополісахарид (ЛПС) та складає біля 60 % поверхневого білку ЕТ. ЛПС містить три різних антигенних домени; реактивною його частиною є 2-кето-3-дезоксіоктанова кислота. Його ММ у різних сероварів незначно відрізняється та становить 38-45 кДа. ОБЗМ стійкий проти дії високих температур (витримує прогрівання при 100 °С протягом 30 хв.), трипсину, папаїну, нуклеаз, розчинний в ефірі й ацетоні. ЛПС лежить на поверхні зовнішньої мембрани паразита, оскільки при проведенні реакції прямої чи непрямої імунофлуоресценції (РПФ, РНФ) видно ободок свічення. ЛПС хламідій вперше виявили за допомогою реакції зв'язування комплекменту (РЗК); цей антиген здатен, крім того, аглютинувати еритроцити мишей, хом'яків та курей<sup>5</sup> [6, 11, 12].

Видоспецифічні антигени хламідій з ММ 150 кДа термолабільні та руйнуються прогріванням при температурах понад 60 °С, при обробці трипсином та фенолом; вони пов'язані з ліпідами та являють собою ліпопротеїни, локалізовані в

- Вносять в лунки стрипів по 100 мкл розчину проявника.
- Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при 18-22 °С у темряві протягом 30 хв.
- Зупиняють кольорову реакцію, вносячи до всіх лунок по 100 мкл стоп-реагенту.

• Не пізніше як через 1 хв після зупинення кольорової реакції визначають ОГ в лунках у двоохвильовому режимі (при 450 нм відносно 620 нм).

*Як виняток, ОГ можна визначати в однохвильовому режимі (450 нм) відносно порожньої лунки (бланк). Необхідно в такому разі залишити порожню лунку при аналізі. При роботі в однохвильовому режимі знижується чутливість та точність аналізу.*

### Облік результатів аналізу

Наявність або відсутність антитіл до *Ch. trachomatis* у досліджених зразках визначають при порівнюванні значень ОГ кожної проби з граничним значенням (ГЗ).

- Розраховують середнє значення ОГ для проб негативного контролю (ОГ<sub>сер К<sup>-</sup></sub>) і для позитивних контролів (ОГ<sub>сер IgG К<sup>+</sup></sub> і ОГ<sub>сер IgA К<sup>+</sup></sub>).

Проведення аналізу вважають коректним, якщо ОГ<sub>сер К<sup>-</sup></sub> не перевищує 0,1 оптичної одиниці (о.о.), а середня ОГ позитивних контролів не нижча за 0,6 о.о.

Якщо одне з трьох значень ОГ К<sup>-</sup> більше за 0,1 о.о. або більш як вдвічі перевищує ОГ<sub>сер К<sup>-</sup></sub>, його відкидають та ОГ<sub>сер К<sup>-</sup></sub> розраховують за рештою значень ОГ К<sup>-</sup>.

- Граничне значення (ГЗ) ОГ. ГЗ розраховують, додаючи константну величину 0,12 до значення ОГ<sub>сер К<sup>-</sup></sub>.

Для оцінки зміни титру антитіл в динаміці рекомендується інтерпретувати результат аналізу в одиницях DIA Units (DU).

$$DU = \frac{\text{ОГ сироватки} \times 10}{\text{ГЗ}}$$

<sup>4</sup> У старій літературі його називали групоспецифічним антигеном.

<sup>5</sup> ЛПС хламідій аглютинують лише еритроцити курей порід Леггорн та Біла підмосковна.

- Готують розчин № 1 згідно з п. 1.1.
- Вносять в усі лунки по 350 мкл розчину № 1, тримають там розчин протягом 30-40 секунд та видаляють його за допомогою промивача або 8-канальної піпетки, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).
- У кожну лунку стрипів вносять по 80 мкл розчину № 3 для розведення сироваток.
- У лунки стрипів вносять по 20 мкл зразків досліджуваних сироваток, залишивши вільними 5 лунок першого ряду (лунки для контролів).
- У дві лунки (A1, B1) вносять по 20 мкл позитивного контролю IgG K<sup>+</sup> або IgA K<sup>+</sup>, в залежності від досліджуваних антигін, а в три інші (C1-E1) - по 20 мкл негативного контролю (К). *При внесенні контрольних та досліджуваних зразків необхідно обережно піпетувати суміш.* (Під час піпетування колір розчину в лунках змінюється).
- Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37 °С протягом 60 хв.
- Після закінчення інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки чотири рази розчином № 1, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).
- Готують розчин кон'югату згідно з п. 1.2. В залежності від того, наявність антигін якого класу необхідно виявити в досліджуваних зразках, використовують кон'югат анти-IgG або анти-IgA.
- В лунки стрипів вносять по 100 мкл розчину кон'югату.
- Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при 37 °С у термостаті протягом 30 хв.
- Після закінчення інкубації видаляють розчин кон'югату з лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки шість разів розчином № 1, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).
- Готують розчин проявника згідно з п. 1.3.

клітинній стінці хламідій; ці антигени виявляються в реакціях нейтралізації, гемаглютинації, преципітації, РЗК [8].

Розбіжності поміж штамами хламідій виявляють у тесті захисту від токсичності на мишах [4, 6], коли антигін проти певного штаму забезпечують чи не забезпечують захисту мишей від патогенного впливу іншого штаму. Використання мікрометоду імунофлуоресценції дозволило диференціювати серед людських штамів *Ch. trachomatis* 15 сероварів і один окремих біовар, що викликає пневмонію в мишей<sup>6</sup> [6, 12].

Типоспецифічні антигени хламідій – це поліпептиди з MM 27-32 кДа, присутні в препаратах ET та PT. Їх можна виявляти за допомогою моноклональних антигін (МКА) при імуноелектронній мікроскопії. Типоспецифічність названих антигенів встановили завдяки їхній здатності зв'язуватися в імуноблоті тільки з гомологічним антигінлом, яке виникло проти збудника певного серологічного варіанту [1, 5, 6, 12].

Типоспецифічним антигенам притаманна висока імуногенність. Антигін, що впізнають типоспецифічні антигенні детермінанти – це єдині антигінла, які нейтралізують інфекційну активність хламідій в культурах клітин.

Поверхневі антигени хламідій відіграють важливу роль у багатьох життєво важливих функціях паразита (інфекційність, вірулентність, інвазивність, гальмування лізосомної активності клітин хазяїна, токсичність), які можуть бути загальмовані антигінлами.

Хламідійні антигени викликають звичайно слабку загальну імунну відповідь. Більшість хламідіозів пов'язана з ураженням слизових оболонок та місцевими (локальними) інфекціями, до яких належать усі урогенітальні хламідійні інфекції (за винятком ВЛГ). При такому характері захворювань

<sup>6</sup> Серовари А, В, В<sub>a</sub> і С тотожні очним штамам *Ch. trachomatis*, виділеним у зонах, де виявлено ендемічні осередки трахоми. До сероварів D, T, F, G, H, I, та J належать штами, виділені з уражених статевих органів та прямої кишки, а також з легень та з очей хворих з ураженнями статевих органів. Серовари L1, L2, L3 виділено від хворих з клінічними ознаками ВЛГ; серовар К - імунологічне споріднений з L3, але виділений від хворих без клінічних ознак ВЛГ. Серовари *Ch. trachomatis* D, T, F, G, I, J та K – це головна причина хламідіозів, що передаються статевим шляхом.

хламідійні антигени викликають місцеву імунну реакцію і, як правило, індукують низькі рівні гуморальних антитіл.

Через неясну симптоматику хламідійних захворювань, а часто й через цілковиту відсутність ознак недуги особливого значення при виявленні цих патологій набувають методи лабораторної діагностики [4, 5, 8]. Завдяки добрим результатам лікування хламідіозів за допомогою антибіотиків досконала діагностика цих захворювань дозволила б виявляти осіб, що стали безсимптомними носіями, належно їх лікувати та запобігати розповсюдженню хламідійних хвороб.

### Методи лабораторної діагностики

Сучасна практика діагностики хламідійних інфекцій не забезпечує повного їх виявлення. Тому для такої мети застосовують не менш як два різні методи. У першому випадку виявляють збудника хвороби. Непрямі методи базуються на серологічних тестах, коли в лабораторії досліджують сироватку чи плазму крові (для виявлення специфічних антитіл).

#### Культуральний метод

Діагностичне виділення збудника за допомогою зараження курячих зародків та культур чутливих клітин (наприклад, *Ch. trachomatis* добре росте в культурі клітин McCoу, а *Ch. pneumoniae* – в культурі перещеплюваних клітин HEp-2) вимагає багато зусиль, причому не завжди вдається добитися росту хламідій (через 3-7 днів). Цей метод істотно поліпшено завдяки застосуванню поліетилеңгліколу (ПЕГ) чи 1 % розчину ДЕАЕ-декстрану, які сприяють збереженню структури збудника та допомагають його проникненню у попередньо оброблені клітини; додаткові можливості виявляти збудника надає також подовження терміну вирощування паразита [13]. Часто позитивний результат можна отримати при перещеплюванні первинно заражених культур, в яких після першого пасажу не виявлено цитопатогенної дії збудника та його структур через незначну їх кількість (йдеться про так звані метод сліпих пасажів) [14]. Культуральний метод – це референтний метод при діагностиці хламідіозів [1]. Однак на практиці для діагностики урогенітального хламідіозу культуральний метод

### Підготовчі роботи до проведення аналізу

1 Підготовка до аналізу (з розрахунку на 16 лунок).  
Витримують компоненти набору при температурі 18-22 °С протягом 30 хв.

Заповнюють схему внесення та ідентифікації зразків.

#### 1.1 Приготування розчину №1 для промивання планшета

Вміст одного флакону концентрату розчину № 1 інтенсивно перемішують. Відбирають 6 мл розчину і розводять в 270 мл дистильованої води, перемішують. Якщо концентрат розчину містить кристали, його прогрівають перед використанням при 35-37 °С до повного розчинення солей.

Розчин можна зберігати при температурі 2-8 °С не більш як 5 діб.

#### 1.2 Приготування розчину кон'югату

В чистий флакон відбирають 2 мл розчину № 4 для розведення кон'югату та додають 40 мкл кон'югату анти-IgG або анти-IgA, в залежності від того, антитіла якого класу мають досліджувати в зразках. Вміст флакону ретельно перемішують, не допускаючи утворення піни.

Розчин готують безпосередньо перед використанням, він зберіганню не підлягає.

#### 1.3 Приготування розчину проявника

У чистий флакон відбирають 1 мл хромогену ТМБ і додають 1 мл розчину № 5Т для приготування проявника; суміш інтенсивно перемішують.

Розчин проявника необхідно оберігати від попадання світла та контакту з металами або іонами металів. Перед використанням розчин проявника має бути безбарвний. Забарвлення розчину у флаконі з проявником протягом кількох хвилин після розчинення свідчить про забруднення посуду чи розчину. Такий проявник треба замінити.

Розчин готують безпосередньо перед використанням, він зберіганню не підлягає.

### 2 Проведення аналізу

- Перед проведенням аналізу виймають з упаковки необхідну кількість стрипів і вставляють їх у рамку. Стрипи, не використані у даній постановці, зберігають у щільно закритому пакеті при температурі 2-8 °С протягом 1 місяця.

- використовуйте вимитий та промитий дистильованою водою посуд для приготування реагентів;
- використовуйте новий наконечник для внесення кожного зразку;
- не допускайте підсихання лунок на всіх етапах постановки ІФА;
- перевіряйте точність дозування, слідкуйте за робочим станом піпеток та іншого обладнання;
- уникайте попадання прямих сонячних променів на робочу поверхню під час проведення аналізу;
- етап промивки дуже важливий при постановці аналізу; не зменшуйте кількості та часу промивок; переконайтеся, що всі лунки стрипів щерть заповнюються промивним розчином. Лунки повинні заповнюватись щерть (вносити по 350 мкл в кожну ямку), але не можна допускати переповнення лунок та перетікання рідини з сусідніх лунок. Рекомендується використовувати автоматичний промивач (вошер) або 8-канальну піпетку, причому слід не тільки заливати, а й видаляти розчин з лунок піпеткою. Неправильне промивання може призвести до помилкових результатів.

#### **Підготовка зразків**

Для тестування необхідно використовувати нерозведену сироватку або плазму крові людини. Зразки сироваток чи плазми зберігають при температурі 2-8°C протягом 72 год. Допускається заморожування зразків (бажано до температури нижче як мінус 20 °C) не більше двох разів. Необхідно освітлювати зразки сироваток (плазми), які містять агрегати та осад, за допомогою центрифугування. Зразки не можна нагрівати більш як до 56 °C. Зразки з азидом натрію, гемолізом, гіперліпемією або бактеріальним проростом не придатні для аналізу.

використовують рідко, бо для цього необхідно мати спеціально облаштовану лабораторію для роботи з культурою клітин та висококаліфкованих фахівців; тому культуральний метод використовують в основному з науковою метою та для порівняльної оцінки специфічності та чутливості інших методів діагностики.

Серед інших методів діагностики хламідіозів звичайно застосовують РЗК, РПІФ, РНІФ, різні модифікації імуноферментного аналізу (ІФА) та ДНК-діагностики.

#### Імунофлуоресцентні методи

Досі найпоширенішим діагностичним підходом лишається РНІФ (вивчаються зішкряби епітеліо уrogenітального тракту). Будь-який сучасний варіант імунофлуоресцентного аналізу цінний тим, що у випадку позитивної відповіді в реакції він дозволяє встановити, з якою ж саме структурою пов'язаний антиген, що спричинив позитивну відповідь, і чи дійсно такою структурою є та чи інша форма розвитку хламідій. На відміну від інших методів, РНІФ дозволяє відразу ж виключити хибно-позитивний результат, бо у люмінесцентному мікроскопі видно, з якою саме структурою пов'язаний антиген, що приєднав антитіла, мічені флуорохромом [2, 15].

Діагностичні набори, призначені для визначення хламідійних антигенів у РПІФ на основі МКА (проти ОБЗМ чи проти родоспецифічного ЛПС), випускають численні закордонні фірми (Syva, Difco, Kallstad, Bartels, California Integrated Diagnostics). Російська фірма ЗАТ "НИАРМЕДИК" при НДІ епідеміології та мікробіології ім.М.Ф.Гамалєї (Москва) виробляє високоякісні МКА проти ЛПС. Чутливість та специфічність РПІФ при використанні МКА становлять 65-90 % та 85-90 %, відповідно [5].

#### Імуноферментні методи

Імуноферментний аналіз широко застосовується для діагностики в інфекційній патології. За допомогою ІФА можливо визначати наявність специфічних антитіл та антигенів, їх титр (або кількість). Увесь процес імуноферментного аналізу можна розділити на три основних стадії: формування специфічного комплексу антиген-антитіло (імунохімічний

процес), введення в нього (приєднання до нього) мітки та її виявлення (візуалізація).

У сучасній клінічній практиці при діагностиці хламідіозів найчастіше застосовують набори реагентів для ІФА (Imx Select Chlamydia, Abbott Laboratories; Chlamydia-Antigen ELISA, Medac Diagnostica), призначені для виявлення розчинних антигенів паразита [1, 6, 7]. У першому випадку застосовано технологію визначення ЛПС на мікрочасточках. ЛПС, екстрагований з проби, вносять у лунки планшета, де міститься суспензія мікрочасточок. Аліквота реакційної суміші, де утворено комплекс часточок з ЛПС, переноситься на скловолокнистий матрикс реакційної камери. Часточки безповоротно зв'язуються з цим матриксом. На матрикс наносять кролячі антитіла проти хламідій, які приєднуються до ЛПС. При додаванні біотинільованих козячих антитіл проти кролячих антитіл вони зв'язуються з попередньо утвореним комплексом (ЛПС з кролячими антитілами проти хламідій). Потім на матрикс наносять кон'югат лужної фосфатази з антитілами проти біотину. Цей кон'югат приєднується до комплексу антиген-антитіло. Після відмивання реагентів, що не зв'язалися з комплексом, проводять ферментативну реакцію (додають флуоресцентний субстрат для лужної фосфатази) з утворенням продукту, який дає флуоресценцію. Його кількісно визначають за допомогою спеціальної апаратури.

При роботі з тест-системою „Chlamydia-Antigen ELISA” на тверду фазу наносять МКА встановленої специфічності. “Ампліфікації досягають завдяки застосуванню запатентованої технології полімерної кон'югації, в результаті чого відбувається фіксація, при якій на кожну зв'язану ділянку антигену припадає полімерний комплекс з високомолекулярним фрагментом. Крім того, ампліфікація відбувається також на стадії відтворення з використанням запатентованої технології ампліфікації ферменту”. Позитивні проби забарвлюються; точні результати дослідження, тобто оптичну густину (ОГ) цих проб, визначають спектрофотометричним методом. За найновішими повідомленнями, чутливість та специфічність методів ІФА становлять відповідно 65-70 % та 90-100 % [2].

- апарат для промивання планшетів (вошер);
- спектрофотометр для вимірювання ОГ у планшеті;
- контейнер для збирання твердих забруднених відходів;
- контейнер для зливу відпрацьованих забруднених рідин.

### Необхідні застереження

Заходи безпеки при застосуванні набору:

- роботу проводити в спеціально обладнаному приміщенні;
- для приготування негативного та позитивних контролів використовуються інактивованій матеріал людського походження, однак жоден з відомих методів тестування не гарантує відсутності інфекційного агента; отже, реагенти та сироватки від пацієнтів можуть бути небезпечними; тому необхідно працювати в гумових рукавичках, а також ретельно мити руки після роботи зі зразками та компонентами набору;
- не підпалювати розчини ротом;
- зразки та реагенти людського походження, а також забруднені матеріали необхідно знезаражувати після проведеної роботи: інструменти, обладнання, а також робочі поверхні протирати 70° етиловим спиртом.
- всі розчини обробляти 6 % розчином перекису водню при кімнатній температурі протягом 3 год. або розчином гіпохлориту натрію (1 %) протягом 30 хв.;
- всі тверді відходи збирати в спеціальний контейнер, стерилізувати в автоклаві протягом 2 год. при температурі 122°C або занурювати в 5 % розчин гіпохлориту натрію на 30 хв.;
- ЗАБОРОНЕНО АВТОКЛАВУВАТИ РОЗЧИНИ З ГІПОХЛОРИТОМ НАТРІЮ.

### Правила роботи з тест-системою:

- не використовуйте набір після закінчення терміну придатності;
- не змішуйте компоненти наборів різних серій;
- не змінюйте процедури аналізу;
- ретельно перемішуйте реагенти при підготовці та проведенні аналізу;

Тест-систему "DIA-Chlamydia" науково-виробничої компанії "Діапроф-Мед", призначену для визначення антитіл проти *Ch. trachomatis*, та методику роботи з нею описано далі.

Таблиця 3 До складу набору входять:

| N  | Назва компоненту                                                  | Кількість      |
|----|-------------------------------------------------------------------|----------------|
| 1  | Концентрат розчину № 1 для промивання планшета                    | 3 фл. по 25 мл |
| 2  | Імуносорбент                                                      | 2 планшети     |
| 3  | Розчин № 3 для розведення сироваток                               | 1 фл., 20 мл   |
| 4  | Розчин № 4 для розведення кон'югату                               | 1 фл., 26 мл   |
| 5  | Концентрат розчину № 5Т для приготування проявника                | 1 фл., 14 мл   |
| 6  | Хромоген ТМБ                                                      | 1 фл., 14 мл   |
| 7  | Кон'югат імуноферментний анти-IgG                                 | 1 амп., 0,6 мл |
| 8  | Кон'югат імуноферментний анти-IgA                                 | 1 амп., 0,6 мл |
| 9  | Позитивний контроль, що містить антитіла класу IgG до хламідій    | 1 амп., 0,6 мл |
| 10 | Позитивний контроль, що містить антитіла класу IgA проти хламідій | 1 амп., 0,6 мл |
| 11 | Негативний контроль                                               | 1 амп., 0,9 мл |
| 12 | Стоп-реагент                                                      | 1 фл., 25 мл   |
| 13 | Клейка плівка                                                     | 6 шт.          |

#### Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

- вода дистильована;
- перекис водню, 6 %;
- спирт етиловий, 70°;
- вага гігроскопічна;
- фільтрувальний папір;
- піпетки одноканальні (5-40, 20-200, 200-1000 мкл) та наконечники до них;
- піпетки 8-канальні (50-300 мкл) та наконечники до них;
- мірна склянка або циліндр (1000 мл);
- ванночки для реагентів;
- флакони для реактивів, 20 мл;
- сухо-повітряний термостат на 37°С;

#### Полімераза ланцюгова реакція

Один з поширених сучасних методів діагностики хламідіозів пов'язаний з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [2, 5, 16, 17] при роботі з матеріалами, отриманими з урогенітального тракту та інших осередків розмноження хламідій (кон'юктива ока, слизова оболонка прямої кишки тощо)<sup>7</sup>. Дана реакція зводиться до багаторазно повторених циклів синтезу (ампліфікації) специфічної області ДНК-мішені в присутності термостабільної ДНК-полімерази, дезоксинуклеотидфосфатів, відповідного буфера та олігонуклеотидних затравок-праймаєрів, які визначають межі ампліфікованої послідовності. Основні мішені при виявленні *Ch. trachomatis* – це нуклеотидні послідовності видоспецифічної критичної плазмиди, гена ОБЗМ та рибосомних генів. Даний метод дозволяє швидко (приблизно через 5 год) виявляти нуклеотидні послідовності збудника у пробах; він високочутливий та дає змогу встановити латентне носійство інфекції. Недоліки згаданого підходу – висока вартість наборів і обладнання, а також необхідність проведення роботи висококваліфікованими спеціалістами.

Проведено чимало порівняльних досліджень, де визначали діагностичну цінність різних підходів для виявлення хламідій чи антитіл проти них за допомогою різноманітних комерційних тест-систем (модифікацій ІФА, ПЛР тощо). В теперішній час рекомендується для проведення скринінгових досліджень використовувати ІФА, а для перевірки результатів ІФА користуватися РІФ чи ПЛР. Якщо йдеться про сутожні умови фінансування, то в популяціях з низькою частотою хламідіозу слід проводити ІФА, аби обстежити велику кількість хворих, бо тоді буде витрачено менше коштів порівняно до ПЛР, а доля хибно-негативних результатів тут порівняно невелика. Ампліфікаційні тести, якщо користуватись ними для скринінгу,

<sup>7</sup> Слід неодмінно пам'ятати, що у сироватці крові дорослих людей виявити нуклеотидні послідовності хламідій неможливо.

у 2-3,7 разів дорожчі за ІФА. Тому дослідники виступають за ампліфікаційні методи при роботі з населенням, для якого ризик хламідійних захворювань високий, а також при дослідженні підлітків, пацієнтів з клініки венеричних хвороб, вагітних жінок та немовлят [5].

За кордоном протягом останніх років як скринінговий метод широко використовують ІФА [12, 18] з наступним підтвердженням результату в РНІФ, для якого застосовують моноклональні антитіла. Для діагностики у чоловіків доцільно брати осад після центрифугування проби сніжної сечі або/та визначати наявність сироваткових антитіл проти *Ch. trachomatis*. При цьому результати серологічних аналізів збігаються з даними культуральних досліджень на 90 %, але при низьких рівнях антитіл частота збігу результатів сильно падає (аж до 60 % і нижче).

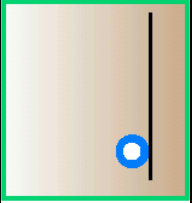
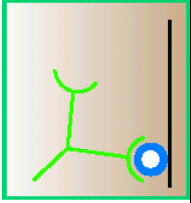
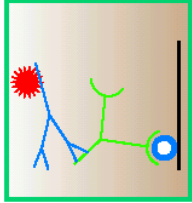
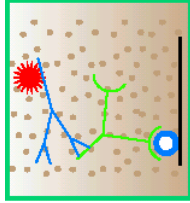
### Специфічні антитіла при хламідійній інфекції

Досконалі серологічні методи, з ІФА включно, дають змогу не лише діагностувати захворювання на хламідіоз, але й визначити період захворювання та характер перебігу хвороби. Це особливо важливо при розвитку хвороби та при її стійких формах, при хронічному її перебігу протягом багатьох місяців та років, коли паразити поступово руйнують тканини та органи. В основі таких підходів лежить визначення специфічних антитіл класів IgM, IgA та IgG, що поступово синтезуються та накопичуються в сироватці крові та в секретах враженого організму на різних етапах інфекційного процесу [2, 4, 12].

На початковому етапі імунної відповіді на хламідійну інфекцію в сироватці крові з'являються антитіла класу IgM. У типовому випадку їх звичайно знаходять через 5 днів після зараження, пік синтезу IgM припадає на перший-другий тиждень після інфікування, а через 2-3 місяці вони зникають з сироватки крові навіть при відсутності лікування. Через відсутність клінічних ознак хвороби в перші місяці після інфікування пацієнтів і запізнілого звертання до лікарні антитіла класу IgM найчастіше не виявляються. IgM – це антитіла гострої фази захворювання, і при повторному зараженні вони не

при довжині хвилі 450 нм пропорційна концентрації специфічних антитіл у зразках сироваток або плазми крові.

### Схема проведення ІФА Етапи аналізу

| Процедура                                                                                                                                                                                              | Формування комплексу                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Полістиролові стрипи, сенсibiliзовані рекомбінантними білками.                                                                                                                                         |    |
| Внесення в лунки стрипів по 80 мкл розчину для розведення зразків і по 20 мкл зразків контролів та сироваток. Інкубація 60 хв. при 37 °С (формування комплексу АГ-АТ). Промивання лунок буфером 4 рази |    |
| Внесення в лунки по 100 мкл розчину кон'югату. Інкубація 30 хв. при 37°С (формування комплексу з кон'югатом). Промивання лунок буферним розчином 6 разів.                                              |   |
| Внесення в лунки по 100 мкл розчину перекису водню і хромогену. Інкубація 30 хв. при кімнатній температурі (забарвлення). Зупинення реакції додаванням стоп-реагенту. Реєстрація оптичної густини.     |  |



### Методика проведення імуноферментного аналізу на тест-системі "DIA-Chlamydia"

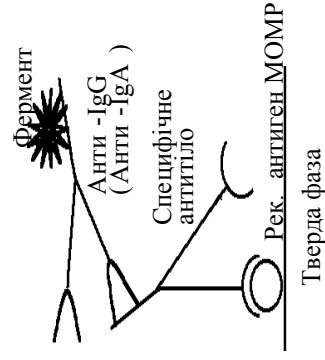
"DIA-Chlamydia" – тест-система імуноферментна для виявлення імуноглобулінів класу G і/або класу А людини до *Chlamydia trachomatis*.

#### Призначення набору

Набір призначено для аналізу сироватки або плазми крові людини на наявність антитіл класів IgG та IgA до *Ch. trachomatis* методом імуноферментного аналізу.

#### Принцип аналізу

Головні компоненти набору – імуносорбент та імуноферментні кон'югати. Імуносорбент – це полістироловий планшет, лунки якого сенсibilізовано видоспецифічним рекомбінантним антигеном *Ch. trachomatis*. Кон'югати (анти-IgG та анти-IgA) – моноклональні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому.



При внесенні в лунки планшета зразків досліджуваних сироваток антитіла, специфічні до *Ch. trachomatis*, зв'язуються з рекомбінантним антигеном на твердій фазі, утворюючи комплекси антиген-антитіло. Утворені комплекси виявляють за допомогою специфічних імуноферментних кон'югатів анти-IgG або анти-IgA. Після відмивання нез'язаних компонентів у лунки додають розчин прованіка, який містить субстрат пероксидази (перекис водню) та хромоген (3,3',5,5'-тетраметилбензидин – ТМБ). Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент (0,5 М розчин сірчаної кислоти), і вимірюють оптичну густина (ОГ) суміші у лунках, яка

утворюються, тому ці антитіла не визначаються при реінфекції і мають для діагностики обмежене значення.

Виявлення секреторних антитіл класу IgA особливо важливе для серодіагностики хламідійної інфекції тому, що даний клас антитіл – це показник як гострої, так і хронічної форми захворювання. Антитіла класу IgA з'являються через 10-14 днів після зараження, паралельно з появою антитіл класу IgG, але у нижчих концентраціях. Їх можна виявляти на початку хвороби в семінальних та вагінальних виділеннях. Наявність антитіл класу IgA одночасно з IgG може свідчити про наростання хронічної хвороби або про стійке переживання (персистенцію) збудника при повній відсутності симптоматики у пацієнтів. Специфічні IgA існують 5-7 днів, у них короткий період піврозпаду. Виявляти їх важливо під час лікування: зниження цих антитіл у 2-3 рази свідчить про успішно проведене лікування. Якщо рівень IgA після проведеного лікування не знижується, це свідчить про можливий перехід інфекції у хронічну форму. Особливо важливо виявляти IgA при проявах хронічної форми інфекції і реінфекціях, коли специфічні IgM не визначаються, а IgG менш показові через триваліший період їхнього існування.

У пацієнтів з безсимптомним перебігом хвороби поява антитіл класу IgA з постійними титрами протягом кількох тижнів свідчить про наявність персистенції збудника і не може розцінюватись як гостра інфекція.

Антитіла класу IgG з'являються починаючи з третього тижня після зараження. Невеликі концентрації їх можуть зберігатися у сироватці протягом багатьох років та свідчити про те, що організм колиш переніс інфекцію. Для постановки остаточного діагнозу слід одночасно визначати специфічні антитіла класів IgA та IgG [12].

Деякі автори [5] використовують отримані серологічні дані для визначення стадії хламідіозу (див. таблицю 1):

Таблиця 1. Серологічне визначення стадії хвороби

| Стадія захворювання       | Визначаються класів:                                   | Динаміка розвитку хвороби   |
|---------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Гостра                    | IgM, IgG, IgA                                          | Швидка зміна титрів антитіл |
| Хронічна                  | IgG, IgA, а при нечітких даних щодо IgA визначають IgM | Титри постійні              |
| Реактивація чи реінфекція | IgG, IgA, рідше IgM                                    | Швидка зміна титрів         |

Важливий показник у серодіагностиці – титр антитіл. Визначення титру (титрування) – це спосіб напівкількісного визначення рівнів специфічних антитіл у сироватці крові. Титр виражається у вигляді дробу, знаменник якого виражає міру розведення досліджуваної сироватки, при якому аналіз дає позитивний результат. Звичайно використовують послідовні двократні розведення (1:2, 1:4... 1:100, 1:200 і т.д.). Для кожного аналізу існує критична величина – той мінімальний титр, при якому результат аналізу вважається позитивним. Частіше титри 1:50-1:100 відносять до сумнівних, а титри, що перевищують 1:100, вважаються за позитивні.

В ІФА звичайно аналіз ставиться з одним розведенням сироватки, а величина титру визначається за формулою, що враховує оптичну густину проби. У сучасних тест-системах титри виражають у міжнародних одиницях (МО) або в нанограмах на мілілітр (нг/мл), а в наборах компанії „Діапроф-Мед” – в одиницях (DU), які розраховують за Міжнародним стандартним зразком, що містить точно визначену кількість антитіл.

Наявність протихламідійних антитіл в сироватці крові свідчить про контакт організму з хламідіями

У таблиці 2 подано результати визначення специфічних протихламідійних антитіл різних класів із застосуванням ІФА, де на імуносорбент нанесено рекомбінантний ЛПС.

Таблиця 2. Визначення протихламідійних антитіл різних класів в ІФА згідно з [ 5]

| Стадія захворювання             | Титри протихламідійних АТ |            |
|---------------------------------|---------------------------|------------|
|                                 | IgG                       | IgA        |
| Початкова чи гостра             | >100-6.400                | > 50-1.600 |
| Хронічна                        | >100-1.600                | >50-200    |
| Реактивація чи реінфекція       | >100-5.200                | >50-400    |
| Остаточний серологічний діагноз | >100-400                  | <50        |
|                                 |                           | IgM        |
|                                 |                           | > 50-3.200 |
|                                 |                           | < 50       |
|                                 |                           | < 50       |

Виявити протихламідійні антитіла вдається за даними [2] у 65-70 % хворих, кількість хибно-позитивних результатів може становити 2-5 %. Рівень антитіл залежить як від імунореактивності організму, так і від швидкості їх елімінації з організму. Тому постановка діагнозу „хламідіоз” за окремим позитивним результатом аналізу на наявність специфічних антитіл не можлива. Найбільш коректно використовувати визначення рівня протихламідійних антитіл для оцінки динаміки перебігу хвороби і здійснюваної терапії. Для цього проводять дослідження парних сироваток крові. Підвищення титрів антитіл в 4 рази і більше свідчить про загострення або прогресування хвороби. Зниження титрів антитіл у ході лікування свідчить про адекватність і ефективність лікувальних процедур [5].

Нижче подано схему проведення ІФА з використанням тест-системи "DIA-Chlamydia" науково-виробничої компанії "Діапроф-Мед" призначену для виявлення антитіл проти *Ch. trachomatis* та методика роботи з нею.