

ГЛАВА 11.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ХЛАМИДИЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Лабораторные исследования являются важнейшим компонентом диагностики хламидийной инфекции. С их помощью устанавливают этиологический диагноз, определяют тактику и оценивают эффективность этиотропной терапии, осуществляют научно обоснованный эпидемиологический надзор. Для современных методов диагностики характерны разная степень информативности и доступности для лабораторных служб различного уровня. В лабораторной диагностике урогенитальных хламидиозов используют общие принципы дифференциальной диагностики воспалительных заболеваний мочеполовых органов, передающихся половым путем, а также целенаправленные методы выявления возбудителя в пораженных клетках и реакций макроорганизма, возникающих при инфицировании хламидиями. Ввиду сходства клинических проявлений воспалительных процессов в мочеполовой системе различной этиологии,

а также частоты смешанных инфекций той же локализации, в первую очередь необходимо исключить гонорею и установить характер микрофлоры в очагах поражения. Исследование мочи (клинический анализ, двухстаканная проба) и микроскопия мазков выделений и секретов позволяют одновременно выявить характер лейкоцитарной реакции и дифференцировать ряд патологических и физиологических состояний. По показаниям также применяют и другие общепринятые лабораторные клинические исследования, необходимые для установления сопутствующей патологии и выбора оптимальных методов лечения.

В настоящее время с помощью методов лабораторной диагностики урогенитальной хламидийной инфекции проводят индикацию хламидий непосредственно в пораженных клетках, выделение хламидий, обнаружение хламидийных антигенов и антител, а также нуклеиновых кислот хламидий. В данном разделе уделено внимание как традиционным, но не утратившим своего значения методам лабораторной диагностики хламидийных инфекций, так и новым перспективным методам.

11.1. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Хламидии не являются высококонтагиозными патогенными микроорганизмами, представляющими особую опасность. Однако пробы, в которой содержатся хламидии, и все материалы, подвергаемые изучению, нужно рассматривать в качестве источников заразного материала и использовать при тщательном соблюдении режима работы бактериологических и вирусологических лабораторий. Следует категорически исключить возможность загрязнения исследуемым материалом рук лабораторных работников, его попадание в рот, нос или глаза (Шаткин, Мавров, 1983; Salkin, Gershon, 1992).

11.2. СБОР И ТРАНСПОРТИРОВКА КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

Лабораторная диагностика начинается со взятия образцов. Надежность метода диагностики определяется не только качеством используемой тест-системы, но также и качеством забора образцов. Так, отсутствие клеток в соскобах слизистых половых органов сильно снижает чувствительность и специфичность методов обнаружения хламидий (Kellogg et al., 1990, 1991; Howard et al., 1991). Способ взятия клинического материала определяется методом детекции хламидий. Так, для диагностического выделения хламидий в культуре клеток наилучшие результаты дают ватные тампоны с алюминиевым стержнем. Деревянные и пластиковые стержни токсичны для культуры клеток (Mahony, Chernesky, 1985). Температура и длительность хранения клинических образцов также зависит от метода определения (комнатная температура, в холодильнике [при +4°С] или в замороженном состоянии). Необходимо строго следовать инструкции, если определение производится с помощью готового диагностического набора (тест-системы). Для транспортировки образцов в лабораторию они помещаются в транспортную буферную среду, наиболее подходящую для данного метода. Образцы для выявления антигенов и нуклеиновых кислот менее требовательны к транспортировке и хранению, поскольку нет необходимости сохранить жизнеспособность возбудителя.

В ряде исследований показано, что случайная и биологическая вариация результатов при взятии одних и тех же образцов у одного и того же больного может достигать до 20% (Taylor et al., 1991). Поэтому, по возможности, необходимо использовать повторные анализы, брать

анализы из разных мест, использовать различные методы лабораторной диагностики (Возинанов, 2002; Мавров, 2002; Lefebvre et al., 1988; Jones et al., 1986; Manuel et al., 1987; Dunlop et al., 1985; Thomas et al., 1985; Singal et al., 1986).

11.2.1. Соскобы слизистой оболочки мочеиспускательного канала, шейки матки, конъюнктивы и других органов

Берут ложкой Фолькмана, малой ушной ложкой или аналогичными инструментами со слегка затупленными краями, соблюдая правила асептики и антисептики. Многоцветные инструменты стерилизуют над пламенем или в 70-градусном этаноле. По возможности следует использовать одноразовые инструменты (цитологические щетки, ватные тампоны) (Ciotti et al., 1988; Moncada et al., 1989; Weiland et al., 1988; Grossman et al., 1993). Наружные половые органы дезинфицируют, выделения удаляют тампонами или с помощью аспираторов. При повышенной чувствительности слизистую оболочку предварительно анестезируют инстилляцией в мочеиспускательный канал 1-2 мл 0,5% раствора дикаина. Соскобы делают из глубины канала (4-6 см), со всех четырех квадрантов. Соскобы шейки матки берут после удаления слизистой пробки из глубины ее канала, а также из влагалищной части шейки матки. При необходимости материал получают и с других доступных участков половых органов (влагалищные складки, парауретральные протоки и др.). Соскобы берут осторожно, при легком надавливании. В материале должно быть минимальное количество выделений и примеси крови (Loefelhoelz et al., 2001; Auguenot et al., 2001; Inhorn et al., 2001).

При экстрагенитальных хламидиозах соскобный материал получают аналогичным способом. Соскобы конъюнктивы берут затупленным глазным скальпелем после анестезии 0,5% раствором дикаина. Для диагностики трахомы лучше брать соскоб с конъюнктивы верхнего века, а для диагностики паратрахомы - с нижнего (Ridgway, Taylor-Robinson, 1991). Соскобы прямой кишки содержат значительную бактериальную обсемененность, что может снижать чувствительность при диагностическом выделении хламидий в культуре клеток (Rompalo et al., 1987). Для таких образцов лучше использовать методы выявления антигена и полимеразную цепную реакцию. Соскобы носоглотки и мазки носового отделяемого могут иметь ценность при диагностике хламидиоза у детей (Paisley et al., 1986; Rapoza et al., 1986). Соскобный материал распределяют тонким слоем на 1/4-1/3 поверхности обезжиренного предметного стекла, подсушивают на воздухе и быстро фиксируют соответственно методу окраски. Для окраски по методу Романовского-Гимзы препараты фиксируют 10 мин абсолютным метиловым спиртом или смесью Никифорова (этиловый спирт + эфир, 1:1) и хранят при комнатной температуре. Фиксацию препаратов для окраски флуоресцирующими антителами или иммунопероксидазным методом проводят абсолютным холодным (+4 °C) ацетоном (х.ч.) в течение 5-10 мин. Допускается кратковременное (несколько дней, при +4 °C) и длительное (месяцы, при -60 °C) хранение фиксированных препаратов, без повторного замораживания и оттаивания (Barnes, 1989; Kellogg et al., 1991, 1992).

11.2.2. Исследование образцов мочи

Первой работой, где показана возможность определения антигена хламидий в моче с диагностической целью была публикация G. Ruijs и соавторов (Ruijs et al., 1984). Позднее O. Caul и коллеги показали, что исследование мочи может быть альтернативой генитальным соскобам

при выявлении антигена хламидий у пациентов с помощью иммуноферментного и иммунофлуоресцентного методов (Caul et al., 1988; Paul & Caul, 1990). Чувствительность и специфичность современных методов молекулярной диагностики позволяет шире использовать образцы мочи, как более удобный и неинвазивный способ забора материала для диагностики на хламидиоз (Coutlee et al., 2000). Забор мочи не требует квалифицированного персонала, и можно обойтись без осмотра (что важно при лабораторном скрининге). Необходимость осмотра гениталий для человека, считающего себя здоровым, часто является тягостным. Методы выявления антигенов и нуклеиновых кислот хламидий могут применяться к образцам мочи при соответствующей обработке (Chernesky et al., 1990; Svensson et al., 1991; Sellers et al., 1991; Mahony et al., 1992; Jang et al., 1992; Schachter et al., 1995). Рекомендовано собирать первую порцию мочи после 4-5-часового воздержания (Crowley et al., 1992). У пациентов с гнойными выделениями из уретры при определении антигенов хламидий иммуноферментным методом следует брать не утреннюю мочу, а после второго мочеиспускания (Sellors et al., 1993). Для последующего иммуноферментного анализа 10-20 мл мочи центрифугируют 30 мин при 3000 об/мин, затем осадок ресуспендируют в соответствующем буферном растворе (в зависимости от тест-системы). У мужчин хламидии в моче находят чаще, чем у женщин (Chernesky et al., 1990; Paul et al., 1990; Schwebke et al., 1991; Leonard et al., 1992; Hay et al., 1991, 1993; Sanders et al., 1994). При получении положительного результата на обнаружение хламидий в моче желательно подтвердить диагноз обнаружением в соскобах слизистой оболочки половых органов (Anderson et al., 1993).

11.2.3. Исследование образцов эякулята

Сперма может быть использована для диагностики хламидиоза. Образцы эякулята для исследования берут после разжижения (Thorsen et al., 1991; Chattopadhyay, Honeycombe, 1990; Van den Brule et al., 1993; Witkin et al., 1993). Сперма содержит вещества (спермин, ионы цинка), которые ингибируют рост хламидий в культуре клеток. Кроме того, мазки спермы плохо фиксируются на стекле при приготовлении препаратов для иммунофлуоресценции (Mardh et al., 1980; Greenberg et al., 1985; Sugarman, Erps, 1985). Поэтому образцы спермы лучше исследовать с помощью полимеразной цепной реакции. При необходимости инокуляции в культуру клеток сперму разводят в 100-1000 раз.

11.2.4. Исследование синовиальной жидкости и биоптатов

Синовиальная жидкость и биоптаты различных тканей могут служить материалом для этиологической диагностики хламидиоза с помощью ИФА, ПЦР и РНК-гибридизации (Keat et al., 1987; Hughes et al., 1991; Poole et al., 1992; Taylor-Robinson et al., 1992; Rahman et al., 1992; Hammer et al., 1992).

11.3. ВЫЯВЛЕНИЕ ХЛАМИДИЙ

Пробы доступной слизистой оболочки (мочеиспускательный канал, шейка матки, конъюнктива, носовая часть глотки и др.) берут в виде соскобов или тем же способом с помощью уретральных и эндоцервикальных стерильных тампонов, приготовленных по типу носоглоточных тампонов на деревянном или металлическом держателе, хранящихся в стерильных пробирках. Предпочтительно использование нетоксичных тампонов из натуральной хлопковой ваты.

Полученный материал тщательно ресуспендируют над пламенем горелки, обычно в 1 мл (при выделении в культуре клеток) или в 2-3 мл (при выделении в куриных эмбрионах) охлажденной стерильной транспортной среды с антибиотиками (помещенной в небольшие, 5 мл флаконы из нейтрального стекла или нетоксичного полимерного материала с мелкими стеклянными бусами) и пересылают (при температуре +4°C) в лабораторию. Заражение культуры клеток и (или) развивающихся куриных эмбрионов проводят в минимально короткие сроки - после 3-часовой экспозиции (+4°C) материала с антибиотиками, а при отсутствии такой возможности материал замораживается при температуре от -60°C до -70°C или при -180°C (жидкий азот). В качестве транспортных сред используют среду 199 с 5% фетальной сывороткой крупного рогатого скота или сахарозо-фосфатный буферный раствор, pH 7,0-7,1 (среда SP-2-SP) с добавлением 5-10% той же сыворотки. Сахарозо-фосфатный буферный раствор 0,2 М (среда 2 SP) готовят при помощи трех растворов: 68,46 г сахарозы растворяют в 50 мл дистиллированной воды; 2,088 г безводной соли K₂HPO₄ растворяют в 60 мл дистиллированной воды; 1,088 г безводной соли K₂HPO₄ растворяют в 40 мл дистиллированной воды. Три названных раствора сливают, доводят объем дистиллированной водой до 1 л добавляют HCl до pH 7,0-7,1. Среду 2-SP стерилизуют во флаконах автоклавированием при 115°C не менее 15 мин, хранят при температуре +4°C. В состав транспортной среды вводят антибиотики: стрептомицин (100-200 мкг/мл), нистатин (25 мкг/мл) и канамицин (100 мкг/мл) или гентамицин (2 мкг/мл), нистатин (25 мкг/мл) и ванкомицин (100 мкг/мл) для подавления сопутствующей бактериальной флоры. Материалы, полученные при диагностических пункциях и биопсиях хирургическим путем (при сальпингитах, пельвиоперитонитах, эпидидимитах, орхитах, артритах и др.), пробы патологоанатомического материала (при пневмониях новорожденных и др.), а также секреты половых желез, мочу и смывы собирают в стерильные флаконы и подвергают вышеописанной обработке и хранению. Для заражения культур клеток или куриных эмбрионов используют 10-40% взвеси изучаемых тканей, приготовленные на тех же средах, или при выделении хламидий в куриных эмбрионах - на мясопептонном бульоне (pH 7,2-7,4). Все материалы, используемые в пассажах, могут храниться в течение суток при температуре +4°C (Шаткин, Мавров, 1983; Taylor-Robinson, Thomas, 1991; Ridgway, Taylor-Robinson, 1991). Лиофилизация клинических образцов для выделения в культуре клеток и в куриных эмбрионах не рекомендуется, поскольку только 5% из них сохраняют инфекционность (Theunissen et al., 1993).

11.3.1. Материал для определения хламидийных антител

Антитела выявляют в сыворотках и секретах. Кровь берут венепункцией, натошак, сыворотку собирают после ретракции сгустка до наступления гемолиза. Сыворотка транспортируется в охлажденном состоянии (+4°C) или замораживается (после ампулирования) и хранится при температуре -20°C. Материалом для исследования служит также капиллярная кровь, собранная на фильтровальную бумагу, в объеме, заранее определенном зоной насыщения. Секреты половых желез собирают либо в нативном виде, либо с помощью полосок фильтровальной бумаги (5x20 мм). Капли секрета или полоски бумаги после насыщения помещают в отдельные сосуды (5 мл), содержащие 0,2 мл фосфатного буферного раствора с pH 7,2. Материал транспортируют и сохраняют так же, как и сыворотки. Первичное разведение материала учитывают при титровании антител.

11.3.2. Индикация хламидий непосредственно в пораженных клетках

Этот метод предусматривает выявление цитоплазматических включений, образуемых хламидиями, при окрашивании морфологических структур микроорганизма. Материалом служат соскобы с доступной слизистой оболочки мочеполювых (мочеиспускательный канал,

шейка матки, канал шейки матки и др.) и других органов (конъюнктивы, прямая кишка и др.) при экстрагенитальных формах хламидийной инфекции. Реже исследуют мазки-отпечатки выделений, секретов и тканей, биопсированных при хирургических вмешательствах. Обнаружение цитоплазматических включений хламидий в эпителиальных клетках препаратов, окрашенных по методу Романовского-Гимзы, является классическим методом диагностики хламидиозов.

Окраска по методу Романовского-Гимзы

Используют готовый основной раствор красителей «азур-эозин по Романовскому» или приготовленный из сухого порошка на 1/15 М-фосфатном буферном растворе (ФБР), pH 7,2. ФБР готовят при помощи двух растворов: первый - 1/15 М- Na_2HPO_4 - получают растворением 9,5 г безводной соли в 1 л дистиллированной воды; второй - 1/15 М- Na_2HPO_4 - получают растворением 9,2 г соли в 1 л дистиллированной воды. Для приготовления 1/15 М-ФБР (pH 7,2) смешивают 72 мл первого раствора, 28 мл второго раствора и 900 мл дистиллированной воды. Для приготовления основного раствора красителя 0,1 г сухого порошка растворяют в 50 мл глицерина (+60°C, 2 ч), добавляют 50 мл абсолютного метанола (без примесей ацетона), тщательно перемешивают, оставляют на ночь для созревания, фильтруют. Основной раствор красителя хранят в плотно закрытых сосудах из нейтрального стекла при комнатной температуре. Рабочий раствор красителя готовят из расчета: 1 часть основного раствора на 10-20 частей 1/15 М-ФБР (pH 7,2) или дистиллированной воды (обязательно при нейтральном pH). Препараты красят свежеприготовленным рабочим раствором 30-45 мин в вертикальном положении - во избежание адсорбции краски на стекле. Окрашенный препарат промывают водой, дифференцируют под визуальным контролем (5-10 с) подкисленным этанолом (3-5 капель ледяной уксусной кислоты на 15-20 мл спирта) или смесью абсолютного этанола и гвоздичного масла (10:1), вновь промывают, подсушивают на воздухе и изучают в световом микроскопе. Препараты для общей оценки предварительно просматривают при большом увеличении микроскопа (об. 40, ок. 7), а затем исследуют при масляной иммерсии (об. 90 или x100, ок. 7). Учитывая качественные отличия красителей, оптимальную концентрацию свежеприготовленного рабочего раствора следует подбирать опытным путем по окраске ядер (красные зерна хроматина), цитоплазмы и ядрышек (светло-голубые) эпителиальных клеток.

При использовании световой микроскопии в окрашенном препарате по Романовскому-Гимза можно обнаружить тельца хламидий. Элементарные тельца - мелкие образования округлой формы (0,15-0,3 мкм), окрашенные в розовый или красноватый цвет и расположенные преимущественно внеклеточно. Ретикулярные тельца - более крупные образования (0,5-1,5 мкм). Они расположены внутриклеточно, в виде скоплений вокруг ядра эпителиальной клетки, и окрашены в голубой или синий цвет. Метод не утратил своего значения из-за доступности для любой лаборатории, простоты выполнения и невысокой стоимости. Кроме того, одновременно с поиском цитоплазматических клеток-включений, учитывается количество лейкоцитов, как показатель воспаления и наличия сопутствующей флоры.

В материале, собранном путем соскоба со слизистой уретры или цервикального канала, возможны выявление и дифференцировка хламидий на ЭТ и РТ по окраске их цитоплазмы обычным световым иммерсионным микроскопом при общем увеличении от 900 до 1500. Однако диагностическая значимость этого метода невелика. Чувствительность цитологического метода ограничена лишь 10-40% при достаточной квалификации лаборанта и больших временных затратах.

Цитоплазматические включения представляют собой компактные или рыхло расположенные зернистые массы, содержащие морфологические структуры возбудителя на разных

этапах его размножения. Они часто определяются вблизи ядра, нередко смещают его к периферии клетки, имеют разнообразную форму, отличаясь по цвету и внутренней структуре от ядра и цитоплазмы. Мелкие ранние включения, содержащие крупные тельца диаметром 0,5-1,2 мкм, имеют сине-фиолетовую окраску, крупные включения с преимущественно мелкими зрелыми структурами возбудителя - розово-красные. Часто в одной клетке выявляются включения хламидий разной зрелости и различной плотности расположения. Нередко при рыхлом расположении морфологических структур микроорганизма обнаруживается содержащая их вакуоль.

Во избежание диагностических ошибок цитоплазматические включения следует четко дифференцировать с другими структурными образованиями, которые могут встречаться в исследуемых препаратах:

- пигментные гранулы черного или темно-зеленого цвета в цитоплазме в виде зернистых масс;
- зернистые структуры травмированного ядра, сходные по цвету, форме и размерам с ядерным материалом неповрежденных клеток;
- зерна муцина, окрашивающиеся в красный или синий цвет, располагающиеся в цитоплазме отдельно друг от друга;
- эозинофильные зерна разрушенных эозинофилов, располагающиеся на поверхности эпителиальных клеток;
- диффузная эозинофильная многомерная зернистость цитоплазмы;
- клеточный детрит, адсорбированный на поверхности или фагоцитированный эпителиальной клеткой;
- сопутствующая микрофлора, включающая часто гонококки, стрептококки, пневмококки, дифтерийные и другие микроорганизмы, которые обычно выявляются не только на поверхности эпителиальных клеток, но и на других участках препарата.

Выявление цитоплазматических включений в препаратах из соскобов позволяет в целом диагностировать около 10-15% случаев хламидийной инфекции, протекающей как манифестно, так и бессимптомно (Шаткин, Мавров, 1983; Мавров, 1994; Мавров 2002).

11.3.3. Выявление антигенов хламидий

Для диагностики урогенитальной хламидийной инфекции используют метод флуоресцирующих антител, который широко применяется при диагностике многих вирусных и бактериальных инфекций. Сущность его заключается в соединении антител, меченных флуорохромом, со специфическим антигеном и наблюдении продукта реакции под люминесцентным микроскопом. Для выявления антигенов хламидий используются также различные варианты иммуноферментного анализа (ИФА).

Метод флуоресцирующих антител

Для разведения реагентов и промывки препаратов используют фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБР), pH 7,2. ФСБР готовят последовательным растворением 6,8 г NaCl, 0,63 г KH_2PO_4 и 1,48 г Na_2HPO_4 в 1 л дистиллированной воды. При монтировании препаратов используют забуференный глицерин (1 часть ФСБР и 9 частей глицерина).

Прямой иммунофлуоресцентный метод

На фиксированный холодным ацетоном, промытый ФСБР и подсушенный на воздухе препарат наносят 1-2 капли его теплого приготовленной окрашивающей смеси: флуоресцирующая хламидийная антисыворотка (или моноклональные антитела) и бычий альбумин, меченный родамином, взятые в равных объемах и удвоенных рабочих разведениях (например, при рабочем разведении 1:64, используют разведение реагента 1:32). Препарат помещают во влажную камеру при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ на 30-40 мин, затем смесь удаляют и препарат тщательно промывают в ФСБР 3 раза по 5-10 мин на магнитной мешалке. На препарат наносят забуференный глицерин, накладывают покровное стекло и сразу же исследуют под люминесцентным микроскопом при комбинации светофильтров и масляной иммерсии (об. х90). Специфичность показателей, получаемых с помощью метода ПИФ, подтверждается следующими контролями, предварительно устанавливаемыми для каждой серии флуоресцирующей хламидийной антисыворотки:

1. тест блокировки - после обработки препарата немеченой ФИТЦ иммунной (хламидийной) антисывороткой, флуоресцирующая (хламидийная) иммунная антисыворотка (или моноклональные антитела) не должна давать заметного окрашивания хламидийного антигена (цитоплазматических включений);
2. тест нейтрализации - после инкубации со специфическим (хламидийным) антигеном флуоресцирующая хламидийная антисыворотка (или моноклональные антитела) не должна давать заметного окрашивания хламидийного антигена (цитоплазматических включений);
3. нормальная, неиммунная меченная ФИТЦ сыворотка того же вида животного-продуцента иммунной хламидийной антисыворотки не окрашивает хламидийный антиген (цитоплазматические включения);
4. в контрольных соскобных препаратах, заведомо не содержащих цитоплазматических включений хламидий, флуоресцирующая хламидийная антисыворотка (или моноклональные антитела) не окрашивает цитоплазму эпителиальных клеток.

1-й, 2-й и 3-й контроли обычно проводят при использовании монослойных препаратов инфицированной культуры клеток, 4-й контроль - на соскобных препаратах исследуемой ткани.

Непрямой иммунофлуоресцентный метод

На подготовленный препарат наносят 1-2 капли сыворотки (кролика, овцы, человека и др.), содержащей хламидийные антитела или раствор моноклональных антител. Препарат помещают во влажную камеру на 30-40 мин при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. Затем сыворотку (антитела) удаляют, препарат тщательно промывают ФСБР и на него наносят смесь антивидовой флуоресцирующей сыворотки (в зависимости от видовой принадлежности использовавшейся сыворотки или моноклональных антител) и бычьего альбумина, меченного родамином, взятых в равных объемах и удвоенных рабочих разведениях. Препарат вновь помещают во влажную камеру при $+37^{\circ}\text{C}$ на 30-40 мин, после чего его промывают, монтируют и исследуют аналогично указанному для прямого метода. Специфичность показателей, получаемых методом НИФ, подтверждается следующими контролями:

- при замене сыворотки, содержащей хламидийные антитела, нормальной сывороткой, полученной от того же вида донора, хламидийный антиген (цитоплазматические включения) не окрашивается;
- в контрольных соскобных препаратах, заведомо не содержащих цитоплазматических включений хламидий, цитоплазма эпителиальных клеток не окрашивается.

Обнаружение цитоплазматических включений хламидий в эпителиальных клетках препаратов из соскобов с помощью флуоресцирующих антител - высокочувствительный и специфический метод диагностики урогенитальной хламидийной инфекции. Метод флуоресцирующих

антител для выявления антигенов хламидий в цитоплазматических включениях можно использовать в прямой и непрямой модификации. При люминесцентной микроскопии антигены хламидий выявляются на темном или оранжевом (при контрастировании родамином) фоне цитоплазмы эпителиальных клеток в виде цитоплазматических включений, флуоресцирующих ярко-зеленым или желтовато-зеленым цветом. Флуоресцирующие включения могут иметь гомогенную, зернистую или смешанную структуру. Специфическая флуоресценция может соответствовать или не соответствовать топографии цитоплазматических включений, а также выявляться в клетках, в которых не удается обнаружить морфологические структуры хламидий при окраске по Романовскому-Гимзе. Большая диагностическая информативность метода флуоресцирующих антител заключается в том, что с его помощью выявляются не только корпускулярные, но и растворимые антигены хламидий, его показатели меньше зависят от изменения тинкториальных свойств хламидий в процессе инфекции, особенно при этиотропной терапии и, наконец, в том, что светящиеся антигены хламидий выявляются легко и быстро. Метод флуоресцирующих антител позволяет обнаружить элементарные тельца хламидий с чувствительностью от 49 до 91 %. Однако клинический опыт показал его недостатки: низкую чувствительность при выявлении хламидий у мужчин; ложноотрицательные результаты, которые могут быть связаны с малым количеством эпителиоцитов в пробе, большим числом лейкоцитов и слизи. Ложноположительные результаты могут быть связаны с наличием антигенов, перекрестно реагирующих с другими бактериями.

Получение моноклональных антител, меченных флуоресцеином, позволило повысить порог чувствительности обнаружения хламидий в люминесцентном микроскопе. Первые оптимистичные результаты, полученные в идеальных лабораторных условиях больших клиник и на популяции больных с достаточным количеством антигена хламидий в отделяемом, давали свыше 95 % чувствительности и специфичности в сравнении с культурой клеток (Tam et al., 1984; Uyeda et al., 1984; Машкиллейсон и Гомберг, 1986; Гомберг и соавт. 1986). Однако впоследствии, когда этот метод был применен для выявления хламидиоза в популяциях с низким распространением хламидиоза и у бессимптомных лиц с персистентной инфекцией, показатели чувствительности не превышали 75%, а специфичности - 65%. (Белозоров, 1999; Возианов и соавт., 2002).

Обычно в диагностических системах применяются видоспецифические моноклональные антитела к МOMP и «родоспецифические» (точнее, специфические к семейству *Chlamydiaceae*) антитела к ЛПС клеточной стенки хламидий. Моноклональные антитела к различным иммунодетерминантам отличаются по характеру флуоресценции, поскольку локализуются на разных структурных компонентах хламидий (Cles et al., 1988). В клинических исследованиях как родоспецифические, так и видоспецифические антитела показывают хорошие результаты при диагностике урогенитальной хламидийной инфекции (Phillips et al., 1988; Tilton et al., 1988; Roblin et al., 1989; Ramirez et al., 1990). Несмотря на высокую специфичность моноклональных антител, могут наблюдаться перекрестные реакции в случае значительного сходства иммунных детерминантов с другими микроорганизмами - *Covsdria ruminantium*, *Salmonella minnesota*, *Acinetobacter spp.* вирус *Parainfluenza 2* (Nurminen et al., 1983; Fox et al., 1989; Jongejan et al., 1991). Может также наблюдаться неспецифическое связывание через Fc-фрагменты.

Метод флуоресцирующих антител неприменим для диагностики персистентной хламидийной инфекции, поскольку базируется на обнаружении антигенных детерминантов МOMP и ЛПС на поверхности хламидий. При персистенции продукция МOMP и ЛПС блокирована,

в то время как ЭТ выявляются только в 8,2% случаев. В данном случае могут работать тест-системы, основанные на выявлении белка теплового шока (Hsp60) и антиидиотипических моноклональных антител (Laferriere et al., 1993).

Метод флуоресцирующих антител субъективен, и учет результатов требует высокой квалификации лаборанта. Присутствие большого числа лейкоцитов, слизи, эритроцитов значительно затрудняет постановку правильного диагноза. Диагностическая ценность метода ниже при исследовании популяции с низкой распространенностью хламидиоза и у бессимптомных пациентов. Чувствительность может колебаться от 50% до 100% у женщин и от 56% до 99% у мужчин (Kellogg, 1989). Считается, что при наличии в образце менее 10 ЭТ хламидий результат может быть ложноотрицательным (Hannover-Larsen et al., 1986; Mabey, Booth-Mason 1986). Могут быть также и ложноположительные результаты. По данным ряда исследований, у 36% пациентов положительный результат, полученный иммунофлуоресцентным методом, не был подтвержден при повторных исследованиях. Упомянутая выше высокая чувствительность и специфичность метода может быть достигнута лишь в тех случаях, когда результаты флуоресценции интерпретируются действительно опытным лаборантом (Gann et al., 1990; Ващенко, 2002; Мавров, 2002).