

К. В. ШАЛЕПО, Е. В. ШИПИЦИНА,
А. М. САВИЧЕВА, М. ДОМЕЙКА

НИИ акушерства и гинекологии
им. Д. О. Отта РАМН,
Санкт-Петербург,
Институт клинической бактериологии,
Уппсала, Швеция

ОБНАРУЖЕНИЕ CHLAMYDIA TRACHOMATIS В РАЗЛИЧНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛАХ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА

В статье представлены данные обнаружения *Chlamydia trachomatis* в различных клинических материалах урогенитального тракта (вагина, цервикальный канал, уретра, моча). Работа проводилась в 1999–2000 гг. в рамках российско-шведского проекта.

Для выявления хламидий использовали одновременно несколько методов — ПЦР, ПИФ, КК.

Определена чувствительность и специфичность методов, использованных при исследовании всех клинических материалов.

До недавнего времени для обнаружения хламидий у женщин использовали соскоб эпителиальных клеток цервикального канала, реже — соскоб из уретры, у мужчин — только соскоб эпителиальных клеток уретры. В последние годы наблюдается тенденция к поиску и дальнейшему использованию неинвазивных (нетравматичных) способов взятия материала для исследования.

Как показывают последние публикации [8, 11, 16, 17], первая порция мочи и материалы из влагалища могут быть использованы для диагностики генитальной хламидийной инфекции мужчин и женщин, особенно при исследовании их молекулярно-биологическими методами. В предыдущей статье мы описали чувствительность и специфичность разных методов, используемых для выявления хламидий [4].

Целью настоящей работы было изучение эффективности использования различных клинических материалов для обнаружения *Chlamydia trachomatis*.

Работа выполнялась в лаборатории микробиологии НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН (Санкт-Петербург, Россия) в рамках договора о сотрудничестве между НИИ АГ и Институтом медицинских наук Уппсальского университета (Уппсала, Швеция) в 1999–2001 годах.

Материалы и методы

Обследованные пациенты

Были исследованы клинические материалы от 397 женщин и 253 мужчин репродуктивного возраста, проходивших обследование в

НИИ АГ им. Д. О. Отта РАМН, которые были разделены на три группы. Первую составили 197 женщин и 50 мужчин с ранее установленным в различных клиниках города диагнозом «хламидиоз». Вторую группу 200 женщин и 203 мужчины составили случайно выбранные пациенты, для которых проводилось скрининговое исследование. В третью группу вошли все пациенты, участвовавшие в программе обследования. Материалами для исследования служили отделяемое влагалища, соскобы эпителия цервикального канала и соскобы эпителия уретры у женщин и первая порция мочи и соскобы из уретры у мужчин.

Процедура взятия клинического материала у мужчин

При взятии клинического материала из уретры для метода прямой иммунофлюоресценции (ПИФ) специальный ватный тампон вводили в мочеиспускательный канал на 2–4 см, вращали его в течение 15 секунд, вынимали и затем вращательным движением наносили материал на два предметных стекла с лунками.

Для методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и культуры клеток (КК) другим тампоном брали следующую порцию материала и опускали его в пробирку с транспортной средой (2-SP).

Первая порция свободно выпущенной мочи в количестве 10 мл помещалась в специальную пробирку.

Процедура взятия клинического материала у женщин

Отделяемое влагалища брали ватным тампоном с боковой и/



или передней стенки, помещали его в пробирку с транспортной средой (2-SP) и исследовали методом ПЦР.

Материал из уретры исследовали методами ПИФ, ПЦР и КК, для чего специальный тампон вводили на 1,5–2 см в мочеиспускательный канал и вращали его в течение 15 секунд. При использовании метода ПИФ материал наносили вращательным движением тампона на два предметных стекла, для ПЦР и КК брали следующую порцию материала и опускали его в пробирку с транспортной средой (2-SP).

Соскоб из цервикального канала исследовали методами ПИФ, ПЦР и КК. Для удаления слизи из экзоцервикса шейку матки интенсивно протирали ватным тампоном. Специальный тампон вводили в цервикальный канал на 1–2 см и вращали несколько раз, нажимая на эндоцервикальную стенку. Для метода ПИФ вращательным движением наносили материал на два предметных стекла, а для методов ПЦР и КК брали следующую порцию материала и помещали его в пробирку с транспортной средой (2-SP).

Хранение проб

Стекла с исследуемым материалом высушивали на воздухе, фиксировали ацетоном при температуре 6 ± 2 °C и хранили в холодильнике (± 2 °C) не более 7 дней до исследования.

Пробирки с материалом для культурального и ПЦР исследования хранили при 2–8 °C не более 24 часов. Для выделения ДНК и проведения ПЦР из пробирок отбирались аликвоты по 100 мкл. В случае необходимости более длительного хранения пробы замораживали при -70 °C до проведения исследования.

Клинические материалы и методы, с помощью которых проводили выявление *Chlamydia trachomatis*, представлены в таблице 1.

Исследования методами ПЦР, ПИФ и КК, а также оценку диагностических тестов проводили способами, описанными ранее [4].

Лабораторные методы и клинические материалы, используемые для диагностики урогенитальной хламидийной инфекции

	женщины			мужчины	
	вагина	цервикс	уретра	уретра	моча
ПЦР	✓	✓	✓	✓	✓
ПИФ		✓	✓	✓	
КК		✓	✓	✓	

Результаты

При обследовании пациентов первой группы с ранее установленным диагнозом «хламидиоз» *C. trachomatis* были обнаружены у женщин в 34,5% (68/197) случаев, у мужчин – в 32% (16/50). У 22,8% (45/197) женщин хламидии выявлены в цервикальном канале, у 14,2% (28/197) в уретре, у 29,4% (50/197) в вагине. У мужчин положительные результаты получены при исследовании уретры – в 32% (16/50) случаев, а при исследовании первой порции мочи – в 22% (11/50). Результаты исследований представлены в таблице 2.

При обследовании пациентов второй группы хламидии обнаружены у женщин в 10,5% (21/200) случаев, у мужчин – в 6,4% (13/203). При исследовании соскобных материалов из цервикального канала частота выявления хламидий составила 5,5% (11/200), из уретры – 3,5% (7/200), из влагалища – 7,5% (15/200). У 5,9% (12/203) мужчин хламидии обнаружены в уретре, у 2% (4/203) – в первой порции мочи. Результаты исследований представлены в таблице 3.

В третьей группе пациентов *Chlamydia trachomatis* были обнаружены у 22,6% (90/397) женщин и у 11,5% (29/253) мужчин. При исследовании разных клинических материалов получены следующие результаты: в соскобе эпителия цервикального канала хламидии обнаружены в 14,1% (56/397) случаев, в эпителии женской уретры – в 8,8% (35/397), в вагине – в 18,4% (73/397); в соскобе эпителия мужской уретры хламидии выявлены в 11,6%

(28/253) случаев, а в первой порции мочи – в 6% (15/253). Результаты исследований приведены в таблице 4.

В таблицах 5, 6, 7 показана эффективность использования разных методов выявления *Chlamydia trachomatis* при исследовании разных клинических материалов: в таблице 5 приведены данные по чувствительности, специфичности, прогностической значимости положительного и отрицательного результата для пациентов I группы; в таблице 6 – для пациентов II группы; в таблице 7 – для всех обследованных пациентов.

Параллельно проводилось сравнение чувствительности и специфичности различных методов лабораторной диагностики при исследовании разных материалов. Самые высокие показатели чувствительности и специфичности показал метод ПЦР. Он универсален и может быть использован для любых материалов и проб. В качестве клинических материалов для обнаружения хламидий, как и следовало ожидать, лучше всего по чувствительности и специфичности подходят соскобы эпителия цервикального канала и уретры у женщин, и соскоб эпителия уретры у мужчин. Эти материалы при их правильном взятии содержат большое количество эпителиальных клеток, что необходимо для метода ПИФ, мало слизи, которая обычно мешает проведению ПЦР. Поэтому, при использовании этих материалов применимы все методы диагностики (ПИФ, ПЦР, КК), которые были высоко чувствительны и специфичны.

Таблица 2

Комбинации истинно положительных результатов обнаружения хламидий в различных материалах у пациентов I группы (197 женщин, 50 мужчин)

Женщины			Число комбинаций	Мужчины		Число комбинаций
Цервикс	Вагина	Уретра		Уретра	Моча	
–	–	–	129	–	–	34
–	–	+	6	+	–	5
–	+	–	13	+	+	11
–	+	+	4			
+	–	–	4			
+	+	–	23			
+	+	+	18			
Всего истинно положительных результатов						
45	58	28	68	16	11	16

Таблица 3

Комбинации истинно положительных результатов обнаружения хламидий в различных материалах у пациентов II группы (200 женщин, 203 мужчины)

Женщины			Число комбинаций	Мужчины		Число комбинаций
Цервикс	Вагина	Уретра		Уретра	Моча	
–	–	–	178	–	–	190
–	–	+	3	–	+	1
–	+	–	7	+	–	9
–	+	+	1	+	+	3
+	–	–	4			
+	+	–	4			
+	+	+	3			
Всего истинно положительных результатов						
11	15	7	21	12	4	13

Таблица 4

Комбинации истинно положительных результатов обнаружения хламидий в различных клинических материалах пациентов III группы (397 женщин, 253 мужчины)

Женщины			Число комбинаций	Мужчины		Число комбинаций
Цервикс	Вагина	Уретра		Уретра	Моча	
–	–	–	307	–	–	224
–	–	+	9	–	+	1
–	+	–	20	+	–	14
–	+	+	5	+	+	14
+	–	–	8			
+	+	–	27			
+	+	+	21			
Всего истинно положительных результатов						
56	73	35	90	28	15	29

Отделяемое влагалища содержит большое количество слизи и разнообразных микроорганизмов, что мешает проведению диагностики с помощью методов КК и ПИФ. Чувствительность и специфичность ПЦР при исследовании вагинальных проб была 75% и 100% соответственно. Однако процедура взятия пробы из влагалища менее травматична. При проведении больших эпидемиологических исследований возможно использование для исследования на хламидии и отделяемого влагалища.

Первая порция мочи также вызывает некоторые сложности при исследовании ее на наличие *Chlamydia trachomatis*. Она содержит мало эпителиальных клеток, может содержать соли, слизь и некоторые микроорганизмы. При исследовании мочи хламидии выявлялись в небольшом проценте случаев и исключительно методом ПЦР. Чувствительность и специфичность ПЦР при исследовании мочи были довольно высокими 100% и 99,6% соответственно. Поэтому исследование первой порции мочи с использованием метода ПЦР возможно, тем более, что способ ее получения является нетравматичным и может быть выполнен пациентом самостоятельно.

Обсуждение

Известно что, *Chlamydia trachomatis* тропны к цилиндрическому эпителию. Поэтому наиболее часто хламидии у людей локализуются в органах, покрытых столбчатым эпителием: в уретре, цервикальном канале у женщин, в уретре у мужчин, в носоглотке у детей [2].

У женщин хламидии вызывают цервицит, уретрит, при восходящей инфекции развивается эндометрит, сальпингит, сальпингоофорит, которые могут приводить к развитию трубного бесплодия, а у беременных – к невынашиванию беременности [1, 3, 5].

У мужчин хламидии, в первую очередь, вызывают уретриты,

Таблица 5

Эффективность выявления *Chlamydia trachomatis* в I группе пациентов (197 женщин, 50 мужчин)

	Методы	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	ПЗ+ (%)	ПЗ- (%)
Женщины	Цервикс ПЦР Crypt	72,1	100	100	92,8
	Цервикс ПЦР Pd1/Pd2	69,8	100	100	92,2
	Цервикс ПИФ Syva	55,6	99,3	96,1	88,4
	Цервикс ПИФ Orion	57,8	100	100	89,0
	Цервикс КК	35,6	100	100	84,1
	Вагина ПЦР Crypt	53,6	99,2	96,8	83,5
	Вагина ПЦР Pd1/Pd2	60,3	98,6	94,6	85,8
	Уретра ПЦР Crypt	63,2	98,6	92,3	91,0
	Уретра ПЦР Pd1/Pd2	78,9	98,6	93,7	94,7
	Уретра ПИФ Syva	59,6	100	100	94,0
	Уретра ПИФ Orion	63,0	100	100	94,5
	Уретра КК	50,0	100	100	88,7
Мужчины	Уретра ПЦР Crypt	75,0	100	100	89,5
	Уретра ПЦР Pd1/Pd2	68,7	100	100	87,2
	Уретра ПИФ Syva	93,7	97,1	93,7	97,1
	Уретра ПИФ Orion	93,7	100	100	97,1
	Уретра КК	68,7	100	100	87,2
	Моча ПЦР Crypt	90,9	97,4	90,9	97,4
	Моча ПЦР Pd1/Pd2	100	97,2	90,9	100

Таблица 6

Эффективность выявления *Chlamydia trachomatis* во II группе пациентов (200 женщин, 203 мужчины)

	Методы	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	ПЗ+ (%)	ПЗ- (%)
Женщины	Цервикс ПЦР Crypt	90,9	100	100	99,5
	Цервикс ПЦР Pd1/Pd2	100	97,9	73,3	100
	Цервикс ПИФ Orion	0	98,4	0	94,4
	Цервикс КК	27,3	100	100	95,9
	Вагина ПЦР Crypt	53,3	99,5	88,9	96,3
	Вагина ПЦР Pd1/Pd2	73,3	98,4	78,6	97,8
	Уретра ПЦР Crypt	57,1	99,5	82,0	98,5
	Уретра ПЦР Pd1/Pd2	85,7	97,4	55,5	99,5
	Уретра ПИФ Orion	0	99,0	0	96,5
	Уретра КК	14,3	100	100	97,0
Мужчины	Уретра ПЦР Crypt	83,3	100	100	99,0
	Уретра ПЦР Pd1/Pd2	75,0	97,4	64,3	98,4
	Уретра ПИФ Orion	41,7	98,4	62,5	96,4
	Уретра КК	25,0	100	100	95,5
	Моча ПЦР Crypt	100	100	100	100
	Моча ПЦР Pd1/Pd2	100	100	100	100

реже – простатиты. При отсутствии адекватного лечения инфекция распространяется на смежные органы – семенные пузырьки, придатки яичка [9].

Использование других клинических материалов, возможность получения их самостоятельно, привлекательны как для пациента, так и для врача, особенно при проведении скрининговых эпидемиологических исследований. Зарубежными авторами проведены различные исследования по определению пределов чувствительности и специфичности при использовании разных клинических материалов.

А. Bianchi и др. (1998) сравнили 28 коммерческих наборов для обнаружения *Chlamydia trachomatis*. Используя лабораторный штамм *C. trachomatis* серовар D, они показали, что ПИФ имеет предел обнаружения от 100 IFU (единиц) на 1 мл, ИФА – 500 IFU/мл. Тест-системы Vidas Chlamydia (BioMérieux) и IDEIA (Dako) более чувствительные ИФА-наборы с пределом обнаружения 100 IFU/мл. Моментальные тесты, основанные на ИФА-технологии, имеют предел обнаружения более 10 000 IFU/мл (в диапазоне от 1000 до 100 000), тогда как ПЦР-метод имеет предел обнаружения 10 IFU/мл [6].

Метод культуры клеток для обнаружения хламидий в первой порции мочи показал низкую чувствительность. Появление новых современных, в частности, молекулярно-биологических технологий привело к переоценке использования этого материала. Чувствительность, специфичность, прогностическая значимость положительного и отрицательного результата для диагностики *Chlamydia trachomatis* в первой порции мочи у женщин была оценена как 88,6%, 99,7%, 96,9% и 99,0% соответственно [8].

При исследовании цервикальных образцов в качестве референс-метода был выбран метод КК, чувствительность которого была 88%, специфичность 100%. При

Эффективность методов выявления *Chlamydia trachomatis* в клинических материалах обследованных пациентов III группы (397 женщин, 253 мужчины)

	Методы	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	ПЗ+ (%)	ПЗ- (%)
Женщины	Цервикс ПЦР Crypt	75,9	100	100	96,3
	Цервикс ПЦР Pd1/Pd2	75,9	98,8	91,1	96,3
	Цервикс ПИФ Syva	49,0	99,4	96,1	87,1
	Цервикс ПИФ Orion	46,4	99,1	89,7	91,9
	Цервикс КК	33,9	100	100	90,3
	Вагина ПЦР Crypt	53,5	99,4	95,0	90,5
	Вагина ПЦР Pd1/Pd2	63,0	98,5	90,2	92,2
	Уретра ПЦР Crypt	69,2	99,4	92,3	96,8
	Уретра ПЦР Pd1/Pd2	75,0	97,5	76,5	97,3
	Уретра ПИФ Syva	67,3	99,7	97,2	94,8
	Уретра ПИФ Orion	61,7	99,1	88,1	96,2
	Уретра КК	47,1	100	100	94,7
Мужчины	Уретра ПЦР Crypt	78,6	100	100	97,4
	Уретра ПЦР Pd1/Pd2	71,4	97,8	80,0	96,5
	Уретра ПИФ Syva	90,5	99,2	95,0	98,5
	Уретра ПИФ Orion	71,4	98,7	87,0	96,5
	Уретра КК	50,0	100	100	94,1
	Моча ПЦР Crypt	93,3	99,6	93,3	99,6
	Моча ПЦР Pd1/Pd2	100	99,6	100	93,7

исследовании первой порции мочи в этой же исследуемой группе метод ЛЦР (Abbott Laboratories Chicago, III) имел чувствительность 94%, специфичность 100%, а метод ПЦР (Roche Amplicor PCR) 100% и 99,7% соответственно, а ПЦР (Cobas Amplicor CT/NG) 94% и 99,2% [11].

Метод ЛЦР (Abbott Park, III) был высоко чувствителен при исследовании всех типов образцов (85,2% для образцов из влагалища, цервикального канала и мочи, 92,6% – для образцов из уретры). Чувствительность методов КК (MicroTrak Syva, Palo Alto, Calif.) и ИФА (MicroTrak EIA, Syva), с последующим подтверждением методом ПИФ (MicroTrak, DFA), для образцов из цервикального канала составляла 74,1% и 74% соответственно. Однако для образцов из влагалища чувствительность методов КК и ИФА/ПИФ составляла 22,2% и 40,7% соответственно [17].

Особый интерес представляет использование первой порции мочи при бессимптомном хламидиозе у мужчин [13]. При исследовании материалов из цервикального канала и уретры методом КК для выявления *Chlamydia trachomatis* совокупность положительных результатов составила 87,3%, а при исследовании материалов из цервикального канала и мочи методом ЛЦР – 94,1% [12]. Некоторые авторы указывают на то, что исследование более одного материала от каждого пациента увеличивает точность постановки диагноза [16].

Наши данные свидетельствуют о том, что традиционно используемые материалы для выявления *Chlamydia trachomatis* (соскоб из цервикального канала, уретры у женщин и уретры у мужчин) возможно исследовать разными методами (ПИФ, КК, ПЦР). При этом достаточно высокими были показатели чувствительности и специфичности методов ПЦР и ПИФ. Культуральный метод диагностики при 100% специфичности имел низкую чувствитель-

ность. При исследовании первой порции мочи у мужчин во всех группах чувствительность и специфичность методов ПЦР были высокими (приблизительно 100%), что позволяет рекомендовать использование этого клинического материала для выявления хламидий. Использование отделяемого влагалища в качестве материала для диагностики хламидийной инфекции ограничено, так как при высокой специфичности метода ПЦР при исследовании этих проб чувствительность его была низкой (в пределах 53%-73%). Но при проведении скрининговых эпидемиологических исследований эти материалы также могут быть использованы.

Литература

1. Анри-Сюше Ж. Хламидиозы в гинекологии // Актуальные микробиологические и

клинические проблемы хламидийных инфекций. — Москва, 1990, с. 46–51.

2. Савичева А. М., Башмакова М. А., Иванова Р. Д., Шаткин А. А., Панкратова В. М. Хламидиоз гениталий и трубное бесплодие // Актуальные микробиологические и клинические проблемы хламидийных инфекций. — Москва, 1990, с. 55–57.

3. Савичева А. М. Акушерские и микробиологические аспекты патогенеза и диагностики генитального хламидиоза // Автореф. дисс. докт. мед. наук. — Санкт-Петербург, 1991.

4. Шалепов К. В., Шипицина Е. В., Савичева А. М., Домейка М. Сравнение методов лабораторной диагностики урогенитальных инфекций, вызываемых *Chlamydia trachomatis*. // Журнал акушерства и женских болезней, том L, 2001, выпуск 4, с. 77–82.

5. Шаткин А. А., Гальпровии (хламидии) и вызываемая ими

патология // Гальпровидозы (хламидиозы) человека и животных, Москва, 1979, с. 5–11.

6. Bianchi A., de Barbeyrac B., Bebear C., Buffet-Janvresse C., Eb F., Janot C., Maisonneuve P., Miguères M. L., Orfila M. L., Scieux C., Alonso J. M. Multi-laboratory comparison of 28 commercially available *Chlamydia trachomatis* test. // In: *Chlamydial infections. Proceedings of the 9th International Symposium on Human Chlamydial Infections*, 1998: 587–94.

7. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. // *J Clin Microbiol*, 1990, Mar; 28(3): 495–503.

8. Gaydos C. A., Howell M. R., Quinn T. C., Gaydos J. C., McKee K. T. Use of LCR with Urine versus Cervical Culture for Detection of *Chlamydia trachomatis* in an Asymptomatic Military Population of Pregnant and Nonpregnant Females Attending Papanicolaou

Smear Clinics. // *J Clin Microbiol*, 1998, vol. 36:5, p. 1300–4.

9. Greedall G. A., Haas S. T., Holbrook K., Walsh B., Schachter J., Phillips R. S. The relationship of *Chlamydia trachomatis* infection and male infertility // *Am. J. Public. Health*.— 1993, v. 83 (7), p. 996–1001.

10. Domeika M. Diagnosis of genital *Chlamydial* infections in humans as well as in cattle, Uppsala, 1994, 25, 47.

11. Pasternack R., Vuorinen P., Pitcäjärvä T., Koskela M., Miettinen A. Comparison of Manual Amplicor PCR, Cobas Amplicor PCR, and LCx Assays for detection of *Chlamydia trachomatis* infection in women by using urine specimens. // *J Clin Microbiol*, 1997, vol. 35: 2, p. 402–5.

12. Ridgway G. L., Mumtaz G., Robinson A. J., Franchini M., Carder C., Burczak J., Lee H. (1996) Comparison of the ligase chain reaction with cell culture for the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection in women. *J Clin Pathol* 49, 116–119.

13. Ridgway G. L., Taylor-Robinson D. (1991) Current problems in microbiology: 1 *Chlamydial* infection: Which laboratory test? *J Clin Pathol* 44, 1–5.

14. Ripa KT, Mardh P.-A. Cultivation of *Chlamydia trachomatis* in cycloheximide treated McCoy cells. *J Clin Microbiol* 1977, 44: 1–5.

15. Ripa K. T. Biological principles of culture of *Chlamydia trachomatis* in cell monolayers. // *Scand. J. Infect. Dis.*— 1982. Vol. 14, Suppl. № 32.— P. 25–29.

16. Schachter J., Moncada J., Whidden R. et al. (1995) Noninvasive tests for diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection: application of ligase chain reaction to first-catch urine specimens of women. *The journal of infectious diseases* 172, 1411–4.

17. Stary A., Najim B., Lee H. H. Vulval swabs as alternative specimens for LCR detection of genital *chlamydial* infection in women. // *J Clin Microbiol*, 1997, vol. 35: 4, p. 836–8.