

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л. Пиневич

6 марта 2014 г.

Регистрационный № 006-0114

**АЛГОРИТМ ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОК
С РЕПРОДУКТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ НА НАЛИЧИЕ
CHLAMYDIA TRACHOMATIS ПРИ УРОГЕНИТАЛЬНОЙ
ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ
инструкция по применению**

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и
микробиологии»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор Полещук Н.Н., к.б.н. Рубаник Л.В.,
к.м.н. Скворцова И.Ю., Дейкун Д.А., Асташонок А.Н.

Минск, 2013

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен алгоритм обследования на наличие *C. trachomatis* женщин с репродуктивными нарушениями (бесплодие, самопроизвольный выкидыш, эктопическая и замершая беременность) и неудачами программ экстракорпорального оплодотворения на фоне воспалительных заболеваний органов малого таза и герпетических высыпаний шейки матки или обнаружения IgM к ВПГ 1 и/или 2 типа или ЦМВ.

Использование данного алгоритма позволит повысить качество лабораторной диагностики хламидиоза, улучшить прегравидарную подготовку пациенток и снизить риск потери последующей беременности, внутриутробной инфекции, гибели плода и новорожденного.

Предназначена для врачей лабораторной диагностики и врачей-акушеров-гинекологов, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь женщинам.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование:

- весы электронные (предел измерений 260 г., погрешность ± 1 мг), или аналогичные (торсионные, др.),
- микроскоп биологический,
- термостат, поддерживающий температуру (37 ± 1) С
- CO₂ инкубатор;
- холодильник, поддерживающий температуру (4 ± 2) °С;
- морозильник
- шкаф сушильный стерилизационный

- автоматические пипетки переменного объема
- ламинарный шкаф 2 класса биологической защиты
- центрифуга высокоскоростная (не менее 10 000 об/мин) с охлаждением
- центрифуга низкоскоростная
- иммуноферментный анализатор
- типовая ПЦР-лаборатория

Реактивы:

- культура клеток;
- среда Дульбекко, модификация среды Игла (DMEM);
- сыворотка крови плодов крупного рогатого скота;
- L-глутамин
- Среда 199,
- вода бидистиллированная (стерильная) ГОСТ 6709–72
- спирт этиловый ГОСТ 18300 и ГОСТ 5962-67;
- перекись водорода ГОСТ 10929;
- раствор гентамицина сульфат 4% ТУ ВУ 101362058.047;
- дез. раствор
- посуда лабораторная (ГОСТ 1770-74);
- пипетки градуированные, ГОСТ 29227;
- пипетки ГОСТ 20292-74 и ГОСТ 29 227-91
- флаконы ФО-10, ТУ 64-2-10-87
- пробирки П -1-20, ГОСТ 1770;
- пробки резиновые размер 14,5
- наборы для ИФА диагностики и ПЦР тест-системы

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Бесплодие, неудачи программ экстракорпорального оплодотворения, неразвивающейся беременности, выкидыши, преждевременные роды, мертворождения, гибель новорожденного.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Прием лекарственных средств и лечебных процедур (спринцевание, использование влагалищных свечей).

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

1. Взятие биологического материала для исследования

У женщин материалом для исследований служит отделяемое из цервикального канала, влагалища и уретры. Забор соскобного материала осуществляют универсальным зондом или ложкой Фолькмана перед началом (за 2–4 дня) или сразу через 1-2 дня после менструации. У женщин после выскабливания полости матки по причине самопроизвольного выкидыша, замершей беременности и др. рекомендуется проводить взятие мазков-соскобов из УГТ не ранее чем через один менструальный цикл.

Перед взятием материала из мочепоолового тракта пациенткам рекомендуют задержку мочеиспускания не менее 1,5-2 ч (для предотвращения смыва пораженных клеток возбудителя струей мочи, а также контаминации сопутствующей микрофлорой).

Забранный материал распределяют на предметном стекле, высушивают на воздухе и фиксируют метанолом. Для выделения возбуите-

лей в культуре клеток или проведения ПЦР анализа соскобный материал, взятый от пациентов, помещают в специальные транспортные среды.

Для серологических исследований используют сыворотку крови. Кровь берут венопункцией, натошак, в объеме 2-5 мл. Образцы цельной крови инкубируют 1 час при температуре 37°C, затем центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 мин, после чего отбирают сыворотку в отдельную пробирку. При необходимости сыворотки хранят при -20°C не более 2-х недель.

2. Проведение микробиологического анализа

Общее клинико-лабораторное обследование пациенток с репродуктивными нарушениями выполняют, руководствуясь приказом №1182 от 09.10.2012 и инструкцией по применению «Метод реабилитации женщин с привычным невынашиванием беременности при специфической инфекции» (Регистрационный номер №082-0906 от 13.12.2007).

Всем женщинам проводят скрининговое бактериоскопическое (микроскопическое) исследование мазка-соскоба из урогенительного тракта (УГТ), окрашенного по Романовскому-Гимза. Это позволяет определить количество лейкоцитов, как показатель воспаления, оценить состояние микрофлоры, визуализировать непосредственно сам патоген, либо специфические включения Гальбершtedтера-Провачека, гигантские клетки (клетки Цанка) с тельцами включений (тельца Коудри) и другие специфические цитологические признаки инфекции(ий) и определить направленность дальнейших исследований для исключения микст-инфекции.

Лабораторную диагностику хламидийной инфекции осуществляют согласно «Инструкции по лабораторной диагностике инфекции, вы-

званной *Chlamydia trachomatis*» (приказ МЗ РБ №486 от 20.05.2009) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Детекция специфических фрагментов ДНК C.trachomatis. Наиболее часто для молекулярно-биологической диагностики *C.trachomatis* используются тест-системы направленные на детекцию специфического фрагмента крипточеской плазмиды возбудителя. Однако, в случае отрицательного результата по выявлению *orf3* гена крипточеской плазмиды *C.trachomatis*, но обнаружения специфического свечения ЭТ и РТ возбудителя в реакции иммунофлуоресценции или одного из класса противохламидийных антител необходимо исключить наличие у пациента бесплазмидного штамма возбудителя, который обладает вирулентностью и патогенностью. Для этого используют зарегистрированные в Министерстве здравоохранения ПЦР наборы направленные не только на детекцию плазмидных, но и хромосомных генов (*ompA*, 16S рРНК, *groEL*). Результаты следует оценивать по критериям, изложенным в таблице.

Результат ПЦР на плазмидный участок <i>orf3</i> гена	Результат ПЦР на фрагмент <i>ompA</i> гена или 16S рРНК, <i>groEL</i>	Заключение (результат)
-	+	положительный
-	-	отрицательный

То есть по результатам ПЦР в случае отсутствия фрагмента ДНК *orf3* гена плазмиды в исследуемой пробе, но наличии фрагмента ДНК *ompA* гена, кодирующего главный наружный мембранный белок или 16S рРНК *C.trachomatis* делается заключение о наличии хламидийной инфекции у пациентки.

Предварительное пассирование возбудителя на клеточной культуре. Учитывая, что аналитическая чувствительность коммерческих наборов составляет 5×10^2 - 5×10^3 ГЭ/мл микроорганизма в биологической пробе при отрицательных результатах ПЦР диагностики на фоне сохранения клинических проявлений, наличия УЗИ признаков хронического воспалительного процесса органов малого таза у женщины, отсутствия беременности следует провести не менее 2-3 «слепых» пассажей в культуре клеток (КК) с последующей идентификацией *C. trachomatis* полимеразной цепной реакцией или методом флуоресцирующих антител.

Выявление видоспецифических иммуноглобулинов классов G/M/A. При отсутствии возможности проведения культурального исследования рекомендуется проведение иммуноферментного анализа (ИФА) по выявлению IgA, IgM и IgG к липополисахаридному белку *C. trachomatis*. В случае получения отрицательных результатов дополнительно необходимо исследовать сыворотку крови на наличие IgG к белку теплового шока Hsp60 хламидий и IgG к главному наружному мембранному и плазмидному белку (MOMP+pgp3) *C. trachomatis*. Это повышает чувствительность (до 76%) и специфичность (до 85%) серологической диагностики хронической хламидийной инфекции.

В целом для постановки точного лабораторного диагноза хламидийной инфекции на фоне персистенции вирусов семейства *Herpesviridae* необходимо использовать сочетание нескольких методов (не менее двух-трех), один из которых направлен на детекцию специфического фрагмента ДНК либо самого возбудителя, второй – на определение специфических антител. Наиболее оптимальны следующие сочетания методов: ПЦР+ИФА и КК+ИФА.

Алгоритм обследования женщин с репродуктивными нарушениями на наличие *Chlamydia trachomatis* на фоне герпетической инфекции схематично представлен в приложении 1.

Контроль излеченности проводится трижды: 1 – не раньше чем через 1 месяц после терапии, 2-ой и 3-й – с интервалом 1 месяц. Используются не менее двух методов одновременно.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

- ложные результаты лабораторной диагностики могут быть получены при несоблюдении правил и сроков взятия биоматериала их транспортировки и хранения

- при исследовании методом ПЦР возможно получение отрицательного результата вследствие низкого количества копий ДНК возбудителя (ниже предела чувствительности коммерческих наборов), детекции только фрагмента одной генетической мишени патогена, наличия в забранном материале ингибиторов реакции (кровь, слизь и т.д.)

- в случае L-форм хламидий в культуре клеток могут отмечаться различные степени выраженности цитопатического действия на первом пассаже

- обследование и лечение только одного из партнеров может привести к реинфекции и неудаче восстановления репродуктивной функции

АЛГОРИТМ ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОК
С РЕПРОДУКТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ НА НАЛИЧИЕ
CHLAMYDIA TRACHOMATIS ПРИ УРОГЕНИТАЛЬНОЙ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

