

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич

06.03.2014

Регистрационный № 006-0114

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

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Н.Н. Полещук, канд. биол. наук Л.В. Рубаник,
канд. мед. наук И.Ю. Скворцова, Д.А. Дейкун, А.Н. Асташонок

Минск 2015

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, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование:

- весы электронные (предел измерений 260 г, погрешность ± 1 мг) или аналогичные (торсионные, др.);
- микроскоп биологический;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- CO_2 -инкубатор;
- холодильник, поддерживающий температуру $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$;
- морозильник;
- шкаф сушильный стерилизационный;
- автоматические пипетки переменного объема;
- ламинарный шкаф 2 класса биологической защиты
- центрифуга высокоскоростная (не менее 10000 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-глутами;
- 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;
- дезраствор;
- 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

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 производить взятие мазков-соскобов из урогенитального тракта (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 возбудителей в культуре клеток или проведения ПЦР-анализа соскобный материал, взятый от пациенток, 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 ч при температуре 37°C, затем центрифугируют при 1500 об./мин в течение 10 мин, после чего отбирают сыворотку в отдельную пробирку. При необходимости сыворотку хранят при –20°C не более 2-х недель.

2. Микробиологический анализ

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» (рег. №082-0906 от 13.12.2007).

Всем женщинам проводят скрининговое бактериоскопическое (микроскопическое) исследование мазка-соскоба из урогенитального тракта, окрашенного по Романовскому–Гимзе. Это позволяет рассчитать 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, вызванной *Chlamydia trachomatis*» (приказ МЗ РБ № 486 от 20.05.2009) методом полимеразной цепной реакции.

Детекция специфических фрагментов ДНК C. trachomatis. Наиболее часто для молекулярно-биологической диагностики *C. trachomatis* используются тест-системы, направленные на детекцию специфического фрагмента криптической плазмиды возбудителя. Однако в случае отрицательного результата по выявлению *orf3* гена криптической 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 табл.

Таблица — Критерии оценки результатов ПЦР

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 $5 \times 10^2 - 5 \times 10^3$ ГЭ/мл микроорганизма в биологической пробе при отрицательных результатах ПЦР-диагностики на фоне сохранения клинических проявлений, наличия УЗ-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 иммуноферментный анализ 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 2–3), 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.

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

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Ложные результаты лабораторной диагностики могут быть получены при несоблюдении правил и сроков взятия биоматериала, их транспортировки и хранения.

2. 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 материале ингибиторов реакции (кровь, слизь и т. д.).

3. В случае L-форм хламидий в культуре клеток может отмечаться различная степень выраженности цитопатического действия на первом пассаже.

4. 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**

