

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь
_____ О.В. Арнаутов
11 апреля 2011 г.
Регистрационный №122-1210

ВЫЯВЛЕНИЕ ВРОЖДЕННОГО ХЛАМИДИОЗА У ПЛОДОВ И НОВОРОЖДЕННЫХ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ СЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА И ПЛАЦЕНТЫ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

ГУ «Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии»,
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
УЗ «Могилевское областное патологоанатомическое бюро»,
УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро г. Минска»

АВТОРЫ:

д-р. мед. наук, проф. Черствый Е.Д.,
д-р. мед. наук, проф. Полещук Н.Н.,
канд. мед. наук, доц. Летковская Т.А.,
канд. биол. наук, Капитулец С.П.,
канд. биол. наук Капитулец Н.Н.,
Ермоченко В.А.,
Ющенко О.Н.,
канд. биол. наук Рубаник Л.В.,
Асташонок А.Н.

Минск 2010

Актуальность проблемы перинатальной патологии определяется снижением репродуктивного потенциала и сохраняющейся депопуляцией. Врожденная хламидийная инфекция (ВХИ) является регулярно регистрируемой в мире патологией и занимает важное место в структуре репродуктивной гибели плодов и новорожденных. ВХИ может являться причиной целого ряда клинических форм, имеющих как острое, так и хроническое течение, заканчивающихся преждевременными родами, самопроизвольными абортами и неразвивающейся беременностью, а также гибелью плода или развитием послеродовых воспалительных процессов у матери и ребенка. Для установления точных причин гибели плодов и новорожденных необходимы комплексные диагностические исследования с целью выявления ВХИ в секционном материале и плаценте. Полученные результаты могут быть основанием внесения изменений в тактику ведения конкретного пациента и назначения адекватного лечения.

Инструкция разработана с целью повышения эффективности диагностики ВХИ, вызывающей гибель плодов и новорожденных, и содержит рекомендации по методам исследования секционного материала и плаценты.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Исследование секционного материала и плацент при подозрении врожденной хламидийной инфекции.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказания к применению отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ

1. Автоклав.
2. Автоматические микропипетки.
3. Баня водяная.
4. Весы лабораторные 2 класса точности.
5. Весы торсионные.
6. Гомогенизатор.
7. Иономер.
8. Источник питания (источник постоянного тока).
9. Заливочный центр.
10. Лабораторная посуда (пенициллиновые флаконы, пипетки градуированные, пипетки пастеровские, стекла предметные, стекла покровные, чашки Петри и др.).
11. Мешалка магнитная.
12. Микроскоп инвертированный.
13. Микроскоп люминесцентный.
14. Микроскоп световой.
15. Микроскоп электронный.
16. Микротом.

17. Микроцентрифуга.
18. Прибор для горизонтального электрофореза.
19. ПЦР-бокс.
20. Спектрофотометр.
21. Таймер.
22. Термоконтейнер или термос.
23. Термостат суховоздушный.
24. Термоциклер.
25. Тканевой процессор.
26. Трансиллюминатор.
27. Фотокамера с фильтрами для съемки в ультрафиолете.
28. Холодильник-морозильник.
29. Центрифуга высокоскоростная (не менее 10000 об/мин) с охлаждением.
30. Центрифуга низкоскоростная.
31. Шейкер.
32. Шкаф вытяжной.
33. Шкаф ламинарный 2 класса биологической защиты.
34. Шкаф сушильный.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Патоморфологическая диагностика врожденной хламидийной инфекции в секционном материале от плодов и новорожденных и плаценте

Микроскопический метод позволяет непосредственно диагностировать патологический процесс, вызванный *S.trachomatis* в гистологических препаратах, приготовленных из секционного материала и плаценты, в мазках-отпечатках из пораженных органов, конъюнктивы, абортировавших плодов, а также в монослое инфицированных клеток при внесении возбудителя в чувствительную культуру.

Для выявления патологических изменений в тканях, обусловленных репродукцией *S.trachomatis*, из отобранного секционного материала и плаценты готовят гистологические препараты и мазки-отпечатки по стандартным методикам.

Изготовление гистологических препаратов. Кусочки органов умерших плодов и новорожденных, фрагменты плаценты, кишки дегидратируют в батарее спиртов восходящей концентрации с использованием тканевого процессора, заключают в парафин с сохранением ориентации с использованием заливочного центра. Из блоков изготавливают гистологические срезы толщиной 4 мкм, которые окрашивают гематоксилином и эозином, при необходимости — реактивом Шиффа, азур-эозином и по Романовскому–Гимзе. Срезы заключают в «канадский бальзам» или аналогичную среду, покрывают покровным стеклом и микроскопируют в световом микроскопе (увеличение x100–x400).

Препараты просматривают под иммерсией светового микроскопа. В правильно окрашенных по Романовскому-Гимзе препаратах ядра клеток должны быть красно-фиолетового цвета, а цитоплазма — голубого. Хламидийные включения обнаруживаются обычно вблизи ядра в виде глыбок, окрашенных в разные оттенки фиолетового цвета.

При окраске азур эозином ядра клеток окрашиваются в темно-синий цвет, цитоплазма - розовая, хламидийные включения — синего цвета разной интенсивности.

Гистологические критерии диагностики. Морфологические проявления хламидиоза характеризуются своеобразной трансформацией клеток различного происхождения, определяющейся во всех пораженных органах вне зависимости от локализации процесса. Отмечается увеличение в размерах цитоплазмы клеток, ее мелкая вакуолизация и зернистость, которая лучше выявляется при окраске по Шиффу или азур-эозином.

В патоморфологической картине врожденного хламидиоза у новорожденных может иметь место изолированное поражение легких или генерализованный характер инфекции, при котором наряду с легкими определяются изменения в других органах: головном мозге, печени, почках, конъюнктиве глаз.

Изменения в легких, как при изолированном их поражении, так и при генерализованной инфекции схожи и характеризуются полнокровием, кровоизлияниями, десквамацией альвеолярного эпителия. Альвеолоциты, как правило, нерезко увеличены в размере и имеют пенистую цитоплазму, в которой определяются оксифильные включения. В легочной паренхиме отмечается также макрофагальная инфильтрация с небольшой примесью эозинофилов и лимфоцитов; в ряде случаев в сочетании с гиалиновыми мембранами.

В печени отмечается дисконкомплексация, полнокровие, мелковакуолизирующая цитоплазма гепатоцитов, обилие экстрамедуллярных очагов кроветворения (в т.ч. у доношенных), пролиферация ретикулоэндотелиоцитов, лимфомакрофагальная инфильтрация портальных трактов.

В головном мозге доминируют неспецифические процессы в виде отека мозговой ткани, дистрофических изменений нейронов, васкулитов мозговых сосудов. Изменения в мягких мозговых оболочках включают воспалительные и гемореологические процессы. Воспалительная клеточная инфильтрация преимущественно умеренно выражена и носит периваскулярный характер. В воспалительном инфильтрате преобладают мононуклеары с примесью единичных нейтрофильных лейкоцитов. Реологические нарушения включают резкое полнокровие, отек, набухание и очаговый фибриноидный некроз стромы сосудистой оболочки с увеличением количества капилляров. Со стороны венул сосудистой оболочки отмечается резкое расширение просветов, явления сладж-феномена и тромбообразования. Артериолы

спазмированы, малокровны, стенки их утолщены за счет плазматического пропитывания.

В почках отмечаются явления незрелости гломерул, гиалиново-капельная дистрофия эпителия извитых канальцев, иногда определяются клубочковые и канальцевые кисты.

В плаценте при хламидийной инфекции отмечается увеличение объема клеток эпителия амниона, в цитоплазме которых находятся вакуоли, содержащие специфические околядерные включения, заполненные ретикулярными тельцами *S.trachomatis*. Отмечаются участки некроза эпителия. Подобные изменения характерны также для клеток стромы ворсин, эндотелия сосудов и децидуальных клеток. Морфологические изменения плаценты включают поражения как воспалительного, так и невоспалительного характера. Воспаление локализуется в различных структурных элементах последа и наиболее часто представлено гнойно-некротическим париетальным хориодецидуитом, гнойно-некротическим мембранитом, серозным амнионитом. В базальной пластинке и межворсинчатом пространстве определяются скопления лимфоцитов с примесью лейкоцитов. Среди невоспалительных изменений плаценты наиболее часто встречаются диссоциированное созревание, гипоплазия плаценты, отложение фибриноида в межворсинчатое пространство, фиброплазия стромы ворсин, кальцификаты стромы ворсин. В сосудах ворсин может наблюдаться набухание и вакуолизация эндотелия, фибриноидный некроз стенки.

Дифференциальный диагноз выявленных изменений в органах умерших и плаценте:

- внутриутробный герпес
- внутриутробная цитомегалия
- внутриутробные респираторно-вирусные инфекции:
 - внутриутробный грипп
 - внутриутробный парагрипп
 - внутриутробная РС-инфекция
 - внутриутробная аденовирусная инфекция
- внутриутробная краснуха
- внутриутробные гепатиты
- внутриутробная ВИЧ-инфекция
- внутриутробный микоплазмоз
- внутриутробный листериоз
- внутриутробный сифилис
- внутриутробный туберкулез

Алгоритм диагностики и дифференциальной диагностики врожденного хламидиоза на основе гистологических критериев представлен в таблице 1.

Таблица 1.

Морфологическая дифференциальная диагностика врожденного хламидиоза

Заболевание	Отличительные черты
Врожденный хламидиоз	Конъюнктивит, десквамативно-макрофагальная пневмония; активация экстрамедуллярного кроветворения в печени, в мягкой мозговой оболочке — увеличение количества макрофагов, периваскулярные инфильтраты. Во всех пораженных органах отмечается увеличение в размерах цитоплазмы клеток, ее мелкая вакуолизация и зернистость, которая лучше выявляется при окраске по Шиффу или азур-эозином. В цитоплазме клеток визуализируются специфические хламидийные включения.
Внутриутробный герпес	Увеличение размеров клеток и их ядер, фрагментация хроматина с краевым расположением его глыбок в ядре, просветление центральной части ядра с наличием крупного базо- или эозинофильного включения; мелкоглыбчатый распад клеток. В пораженных органах — некрозы без клеточной реакции, расстройства кровообращения
Внутриутробная цитомегалия	Типичный гигантоклеточный метаморфоз (т.н. «совиный глаз»): формирование внутриядерных включений с зоной просветления по периферии. Лимфогистиоцитарные инфильтраты в органах
Внутриутробные респираторно-вирусные инфекции:	
Внутриутробный грипп	Изменения неспецифичны — выраженные расстройства кровообращения, в легких — отечно-геморрагический синдром, дистелектазы, гиалиновые мембраны. В отдельных случаях — набухание альвеолоцитов, базофилия цитоплазмы, просветление ядер, частичная потеря связи клетки со стенкой альвеолы
Внутриутробный парагрипп	Неспецифические изменения в виде набухания и десквамации альвеолоцитов, дистелектазы, отечно-геморрагический синдром
Внутриутробная РС-инфекция	Неспецифические изменения в виде набухания и десквамации альвеолоцитов, редко — пролиферация с образованием симпластов; дистелектазы, отечно-геморрагический синдром
Внутриутробная аденовирусная инфекция	Неспецифические изменения — дистелектазы, отечно-геморрагический синдром, гиалиновые мембраны; в отдельных случаях — типичная трансформация альвеолоцитов с увеличением, гиперхромией и выраженной базофилией ядер, с наличием крупных базофильных включений в центре ядра
Внутриутробная краснуха	Продуктивно-некротический энцефалит, лептоменингит, продуктивные васкулиты, продуктивно-некротический эндофтальмит, увеит, продуктивный дерматит, интерстициальная пневмония с гигантоклеточным метаморфозом альвеолоцитов
Внутриутробные гепатиты	Наиболее часто — эритромиелоз, дистрофические изменения гепатоцитов, умеренный ядерный полиморфизм; реже — гигантоклеточный гепатит с наличием симпластических структур с двухрядной цепочкой ядер, неравномерным фиброзом, пролиферацией желчных протоков
Внутриутробная ВИЧ-инфекция	На ранних стадиях изменения неспецифичны, может отмечаться нарушение созревания тканей, васкулиты; в динамике присоединение оппортунистических инфекций с типичной для них морфологией

Внутриутробный микоплазмоз	В легких — десквамативная пневмония с выраженным геморрагическим компонентом. Альвеолоциты значительно увеличены в размерах, цитоплазма вакуолизирована, содержит ШИК-позитивную зернистость, окрашиваемую также азуром и метиленовым синим. Аналогичные изменения описаны в клетках печени, дистальных отделов нефрона, головном мозге, эндотелии сосудов
Внутриутробный листериоз	Типичные гранулемы (листериомы) в коже, слизистых оболочках, внутренних органах, представляющие собой очаг некроза с большим количеством листерий, окруженный гистиоцитами, моноцитами, лимфоцитами. Характерны тромбоваскулиты
Внутриутробный сифилис	Сифилис плода — мацерация, неиммунная водянка, отек плаценты; в органах обнаруживаются очаги некроза с большим количеством трепонем. Ранний врожденный сифилис — наиболее обширные изменения выявляют в легких (т.н. «белая пневмония»), печени (т.н. «кремневая печень»), костях (специфический остеохондрит); воспаление носит продуктивно-некротический характер, типичны васкулиты, в очагах воспаления выявляются трепонемы
Внутриутробный туберкулез	При гематогенном инфицировании — очаги казеозного некроза в печени, селезенке, фибринозный перитонит; при аспирационном механизме заражения — первичные аффекты в легких с вовлечением регионарных лимфоузлов. Эпителиоидные и гигантские клетки Пирогова–Лангханса не выявляются, диагноз подтверждается обнаружением микобактерий

При отсутствии гистологических признаков, абсолютно специфичных для врожденного хламидиоза, без проведения дополнительной лабораторной диагностики в заключении рекомендуется избегать однозначной формулировки нозологического диагноза. Вместо этого следует указать тип гистологических изменений и высказать предположение о возможных нозологических вариантах. Например: Врожденная серозно-десквамативная пневмония. Данная морфологическая картина возможна при хламидийной инфекции.

Выделение хламидий в культуре клеток

Отбор и доставка патологического материала для выделения C.trachomatis. Основным патологическим материалом для анализа, выявляющего присутствие хламидий и их антигенов у умерших плодов и новорожденных, являются соскобы доступных исследованию слизистых оболочек (конъюнктивы, прямая кишка, абортировавшие плоды, участки пораженных органов: легкие, головной мозг, печень, почки и др.). В связи с тем, что хламидии избирательно поражают цилиндрический эпителий, соскоб должен содержать возможно большее количество эпителиальных клеток и минимальное количество слизи, экссудата и примесей крови. Допускается использование секционного материала и плаценты (кусочки ткани до 1 г). При отборе образцов необходимо строго соблюдать правила асептики. Следует не допускать попадания в исследуемый образец крови.

Материал для исследования следует отбирать не позднее 12–24 ч после прерывания беременности или гибели плода.

Взятый соскобный материал и кусочки органов помещают во флаконы с транспортной средой (0,5 мл), предназначенной для забора и хранения патологического материала. В состав транспортной среды входят сахароза (68,46 г), K_2HPO_4 (2,088 г), KH_2PO_4 (1,088 г), 10% инактивированной (56° С, 30 мин) эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотики: гентамицин (20° мкг/мл), ванкомицин (100 мкг/мл), нистатин (25 ед/мл, рН 7,1).

Доставка патологического материала в специализированную лабораторию производится в холодовом термоконтейнере (до +4° С) или термосе со льдом. Материал для выделения *S.trachomatis* в транспортной среде может храниться в морозильной камере (-20° С) в течение 1 мес. Повторное замораживание-оттаивание не допускается.

Подготовка культуры клеток McCoу для выделения S.trachomatis. Исследования, связанные с работой с культурой клеток и выделением *S.trachomatis*, должны проводиться в отдельном помещении в ламинарном боксе согласно правилам работы с микроорганизмами III группы патогенности.

Для выделения *S.trachomatis* желательно использовать перевиваемую культуру синовиальных клеток человека McCoу как наиболее чувствительную для культивирования хламидий. Допустимо использование перевиваемых культур клеток почки зеленой мартышки (Vero), почки хомяка (ВНК-21) и др. Культуры можно получить в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

Маточный пул клеток хранят в жидком азоте при -196° С.

Культивирование и пассирование клеточных культур проводят по стандартной методике. Для получения посевного материала монослой клеток промывают подогретым до 36–37° С раствором версена (0,02–0,04%) и обрабатывают смесью 0,02–0,04% раствора версена с 0,25% раствором трипсина (1:4) в течение 10 мин при 37° С. После добавления ростовой среды полученную суспензию клеток пипетируют до образования гомогенной взвеси, определяют концентрацию клеток в камере Горяева, доводят их концентрацию до оптимальной 100–150 тыс кл/мл, которая позволяет получить формирование 90–95% монослоя в пенициллиновых флаконах со стеклышками уже на 1–2-е сут культивирования при 37° С. Контроль монослоя клеток осуществляют просмотром в инвертированном микроскопе при увеличении х400.

Подготовка материала. Образец секционного материала и плаценты в транспортной среде, если он заморожен, оттаивают на водяной бане при 37° С.

Во флаконы, содержащие патологический материал, добавляют по 2 мл изолирующей среды. Изолирующая среда готовится на основе среды МЕМ в модификации Дульбеко 1152 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотка, 3% глутамина, 1,25% глюкозы, циклогексимида (20 мкг/мл) и гентамицина (2,0 г). Для придания образцам однородности их взбалтывают

на шейкере или встряхивают со стеклянными бусами. Образцы ткани подвергают гомогенизации. Допускается обработка ультразвуком.

Выделение C.trachomatis в культуре клеток McCoу. В 3 пенициллиновых флакона со стеклышками, содержащими 2-х суточную культуру клеток, вносят по 1 мл однородного патологического материала. Пенициллиновые флаконы центрифугируют при 2500–3000 об/мин в течение 1 ч при 25°С и инкубируют в термостате 2 ч при 37°С. После удаления инокулята во флаконы вносят по 2 мл изолирующей среды с циклогексимидом (2,0 мкг/мл). Инкубируют в термостате 48–72 часа при 37°С.

Оценка результатов. *C.trachomatis* размножается в культуре клеток McCoу, не изменяя внешнего вида среды. Контроль развития хламидийной инфекции осуществляют просмотром стеклышек с зараженными культурами, предварительно окрашенными по Романовскому–Гимзе, с использованием инвертированного микроскопа (увеличение х400). Результат исследования считается положительным, если в культурах с инокулированным патологическим материалом на 2–3-е сут в 30–55% клеток сформировываются характерные для хламидий цитоплазматические включения, содержащие элементарные и ретикулярные тельца *C.trachomatis*. Включения при окраске выявляются в виде компактных или рыхло расположенных, обычно зернистых масс (микроколоний) сине-фиолетового цвета, содержащих морфологические структуры возбудителя, находящегося на различных стадиях развития. В 90% случаев они определяются возле ядра клетки, смещая его к периферии, и отличаются по цвету и внутренней структуре от ядра и цитоплазмы. Интенсивность окраски зависит от соотношения элементарных и ретикулярных телец в хламидийной колонии.

Определение присутствия хламидийных антигенов методом иммунофлуоресценции

Метод позволяет обнаруживать антигены *C.trachomatis* в мазках-отпечатках, гистологических срезах секционного материала и плаценты и инфицированном хламидиями монослое клеток.

Обнаружение антигенов C.trachomatis в мазках-отпечатках. Готовят мазки-отпечатки по стандартной методике. Препараты подсушивают на воздухе, фиксируют в ацетоне 5 мин и обрабатывают диагностическими противохламидийными иммуноглобулинами, мечеными флюоресцеин изотиоцианотом (ФИТЦ), в рабочем разведении. Обработку ведут во влажной камере при температуре 37°С в течение 45 мин. Препараты споласкивают в трех сменах забуференного физиологического раствора рН 7,2–7,4 и в дистиллированной воде, а затем подсушивают на воздухе. При микроскопировании на препарат наносят нефлуоресцирующее (иммерсионное) масло.

Обнаружение антигенов C.trachomatis в гистологических срезах секционного материала и плаценты. Используют кусочки ткани, фиксированные в формалине и заключенные в парафиновые блоки. Из них

получают гистологические срезы толщиной 4 мкм стандартными методами. Перед депарафинированием срезы, помещенные на предметное стекло, должны быть высушены в течение ночи при 37°С. Далее удаляют со срезов парафин, обрабатывая их ксилолом (3 раза по 2 мин в каждой смене). Затем срезы проводят через батарею спиртов по 2 мин в каждом. Тщательно промывают срезы водопроводной водой и споласкивают в дистиллированной воде. Прогревают в дистиллированной воде при 37°С в течение 5–10 мин. Стряхивают со стекол воду и помещают их в 0,1% раствор трипсина на 10 мин (если используют фермент, который хранился в виде раствора более 1 недели, то время протеолитической обработки может быть увеличено). Останавливают ферментативную обработку, опустив стекла со срезами в дистиллированную воду, а затем в трис-содержащий буферный раствор — ТСБ (50 мМ Трис и 100 мМ NaCl в дистиллированной воде, рН 7,6).

Далее на влажные срезы наносят диагностические противохламидийные иммуноглобулины, меченные ФИТЦ, в рабочем разведении. Стекла с нанесенными иммуноглобулинами помещают во влажную камеру, инкубируют при 37°С в течение 30 мин, промывают ТСБ 3 раза по 10 мин и микроскопируют.

*Обнаружение антигенов *S. trachomatis* в монослое инфицированных клеток.* Процедура исследования соответствует таковой при анализе мазков-отпечатков.

Учет результатов. Параллельно с описанными выше манипуляциями следует проставлять контроли специфичности свечения в соответствии с инструкцией производителя люминесцирующих антител.

Полученные препараты исследуют в люминесцентном микроскопе.

Наличие ярко флуоресцирующих зелено-изумрудным цветом гранул различной величины в цитоплазме на фоне окрашенных в красный цвет клеток свидетельствует об обнаружении антигенов хламидий.

Окрашенные препараты рекомендуется изучать под микроскопом немедленно после приготовления. Препараты можно хранить при 4°С, но интенсивность флуоресценции постепенно падает.

Электронно-микроскопическое выявление частиц *Chlamydia trachomatis* методом ультратонких срезов

Подготовку проб из патологического материала проводят по общепринятой методике. Для этого кусочки ткани из очагов поражения (фрагменты органов умерших плодов и новорожденных, плаценту) фиксируют 2,5% раствором глутарового альдегида в течение 4 ч, затем в 1% растворе осмиевого ангидрида в течение 1 ч. Далее образец обезвоживают в спиртах восходящей концентрации: 30% — 30 мин 2 раза, 50% — 15 мин 2 раза, 70% — 15 мин 1 раз, 96% — 15 мин 2 раза, 100% — 15 мин 2 раза и заливают в аралдитовые смолы по общепринятой методике.

Ультратонкие срезы готовят на ультратоме. Срезы окрашивают 1% водным раствором уранилацетата и азотнокислым свинцом в течение 20 мин. Микроскопирование проводят с помощью электронного микроскопа

при различных увеличениях $\times 10000$ – $\times 80000$.

При анализе ультратонких срезов выявляются внутрицитоплазматические репликативные комплексы, содержащие хламидийные тельца на различных стадиях развития (ретикулярные, промежуточные, элементарные тельца). Элементарные тельца представляют собой округлые электронно-плотные частицы диаметром 0,2–0,3 мкм. Ретикулярные тельца имеют ламеллярную структуру и диаметр до 1,0–1,2 мкм.

Выявление *C. trachomatis* и их антигенов в тканях умерших плодов и новорожденных является достаточно уязвимой диагностической процедурой, репрезентативность результатов которой может зависеть от ряда моментов и, прежде всего, качества исследуемого материала. Положительный результат однозначно указывает на наличие у пациента ВХИ. Отрицательный результат при детекции *C. trachomatis* и их антигенов микроскопическим и иммунофлюоресцентным методами не может служить абсолютным доказательством отсутствия ВХИ и диктует необходимость выделения возбудителя в культуре клеток или ПЦР-диагностики, которая позволяет сделать окончательный вывод о наличии либо отсутствии в патологическом материале ВХИ.

Детекция генетического материала (ДНК) *Chlamydia trachomatis* с помощью полимеразной цепной реакции

Детекцию ДНК *Chlamydia trachomatis* в секционном материале от умерших плодов и новорожденных и плаценты осуществляют методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле. Для выявления ДНК *C. trachomatis* могут быть использованы как нативные, так и фиксированные образцы тканей. При работе с фиксированными образцами тканей необходимым этапом является депарафинирование препаратов, осуществляемое перед выделением из них ДНК.

При отборе образцов, а также подготовке проб для исследования необходимо соблюдать меры, предупреждающие обсеменение объектов внешней среды, руководствуясь при этом действующими правилами и инструкциями по данному вопросу: «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции».

Подготовка исследуемого материала. Образцы на исследование доставляют в лабораторию в день взятия или на следующий день, сохраняя их при 4°С. Допускается хранение материала при -20°С в течение 30 дней.

Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводятся пипеточными дозаторами переменных объемов с использованием одноразовых полипропиленовых пробирок на 1,5 и 10,0 см³ и наконечников с аэрозольным барьером.

Образцы паренхиматозных органов и плаценты размером 3х3х3 мм³ помещают в пробирки типа «эппендорф», тщательно растирают отдельными

стеклянными палочками, добавляют по 1 см³ физиологического раствора и тщательно перемешивают. Смесь отстаивают при температуре 20–25 °С в течение 20 мин, после чего 100 мкл верхней фазы используют для выделения ДНК.

Соскоб слизистых оболочек разводят в 0,5–1,0 см³ физиологического раствора, осаждают на микроцентрифуге при 11000–12000 об/мин в течение 8–10 мин. Надосадочную жидкость удаляют, а осадок ресуспендируют в 100 мкл физиологического раствора и используют для выделения ДНК. Если слизь очень густая (не всасывается в отверстие наконечника пипетки), то пробу обрабатывают 1–2 см³ раствора 0,1 М меркаптоэтанола, добавив его в «эппендорф», перемешивают на вортексе, выдерживают при комнатной температуре 3–5 мин и центрифугируют в вышеуказанном режиме. Осадок в 100 мкл физиологического раствора используют для выделения ДНК.

Проведение ПЦР-анализа. ПЦР-анализ проводят в три этапа в трех отдельных помещениях (зонах).

Этап 1. Выделение ДНК из исследуемого материала. Экстракцию ДНК *S. trachomatis* из патологического материала осуществляют с использованием зарегистрированного в Республике Беларусь комплекта реагентов для выделения ДНК из клинического материала. Работу проводят согласно прилагаемой инструкции производителя.

Этап 2. Постановка ПЦР (амплификация ДНК). ПЦР проводят с использованием зарегистрированного набора реагентов для выявления ДНК *S. trachomatis* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле. Работы проводят согласно инструкции прилагаемой производителем.

ПЦР одной анализируемой пробы проводят в суммарном объеме 50 мкл. Для проведения анализа одного образца в каждую микропробирку последовательно вносят следующие компоненты:

- деионизированная вода	33,5 мкл
- буфер для ПЦР, 10х	5,0 мкл
- смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (10 мМ)	1,0 мкл
- праймер 1 (10 пкМ/мкл)	1,0 мкл
- праймер 2 (10 пкМ/мкл)	1,0 мкл
- 5% ДМСО	3,0 мкл
- Taq-полимераза (5 ед/мкл)	0,5 мкл
- ДНК <i>S. trachomatis</i> (10 ⁻¹² г/мл)	5,0 мкл

Все компоненты необходимо добавлять отдельными наконечниками!

В каждую промаркированную микропробирку вносят по 45 мкл реакционной смеси. Добавляют по 5 мкл образца ДНК соответствующей пробы и тщательно перемешивают. Затем в соответствующую микропробирку вносят 5 мкл контрольного образца ДНК (положительный контроль из тест-системы), а в микропробирку, помеченную как отрицательный контроль, добавляют 5 мкл деионизированной воды и

тщательно перемешивают.

Для предохранения от испарения поверх реакционной смеси в каждую микропробирку добавляют по две капли (около 50 мкл) минерального масла, используя пипетку объемом 1 мл.

Микропробирки закрывают и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5–7 с на микроцентрифуге. Потом помещают микропробирки в термоциклер и проводят амплификацию по следующей программе: денатурация — 94 °С, 1 мин; отжиг праймеров — 58 °С, 1 мин; элонгация — 72 °С, 2 мин. Количество циклов: 35–40.

Этап 3. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР

После завершения ПЦР продукты амплификации фракционируют методом электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем этидиум бромид (50 мкг/мл), и наблюдают в ультрафиолетовом свете по общепринятой методике. Наличие специфического фрагмента ДНК определяют с помощью контрольной ДНК исследуемого возбудителя, амплифицированной одновременно с исследуемыми образцами.

В дорожке, соответствующей положительному контрольному образцу, должна быть яркая специфическая светящаяся оранжевая полоса на уровне 330 п.н. Положительными считаются образцы, которые содержат специфическую светящуюся полосу большей или меньшей интенсивности на уровне 330 п.н.

В дорожке, соответствующей отрицательному контрольному образцу не должно быть каких-либо полос. Отрицательными считаются образцы, которые не содержат специфической полосы 330 п.н. Кроме полосы 330 п.н. в дорожках могут наблюдаться нечеткие размытые пятна праймер-димеров, которые располагаются ниже уровня 100 н.п. (в нижней части дорожки).

При работе с патологическим материалом в ПЦР участвует большое количество неспецифической геномной ДНК. При этом в дорожках геля появляются характерные шмеры, равномерно располагающиеся от лунки до самого низа дорожки или концентрирующиеся около лунки. На фоне такого шмера в положительном образце видна специфическая полоса, а в отрицательном образце полоса отсутствует.

Результаты анализа не учитываются, если:

- в дорожке какой-либо пробы отсутствуют обе полосы. Необходимо повторить исследование этой пробы с самого начала. Возможная причина - ошибка на первом этапе работы, приведшая к недостаточной сорбции ДНК или плохой очистке от ингибиторов реакции;

- в дорожке любого отрицательного контроля выявляется специфическая полоса. Возможно, произошла контаминация реактивов и проб положительной ДНК или продуктами амплификации положительной ДНК в процессе работы. Для проверки реактивов необходимо поставить не менее трех отрицательных контролей на этапе выделения ДНК и столько же на этапе постановки ПЦР для выявления источника контаминации. Если результат повторяется, необходимо сменить реактивы.

- в дорожках появляются неспецифические полосы на разных уровнях. Возможные причины: неправильное проведение «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификатора.

Сроки исследований:

- световая микроскопия — от 30 мин до 2 ч;
- выделение возбудителя в культуре клеток — от 3 до 10 дней;
- люминесцентная микроскопия — около 40 мин;
- электронная микроскопия — от 7 до 15 дней;
- выявление ДНК хламидий в ПЦР — от 4 до 5 ч.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ И ОШИБОК

Осложнений при применении комплексной диагностики не зарегистрировано.

Ошибки в осуществлении комплексной диагностики ВХИ могут обуславливаться:

- неправильным забором фрагментов тканей. При приготовлении срезов из непораженных участков органов можно получить ложноотрицательный результат;

- выявлением внутрицитоплазматических включений на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Использование для этих целей данной окраски не является достаточно чувствительным методом и может не позволить определить наличие включений у части пациентов;

- использованием реактивов с истекшим сроком годности или неправильно хранившихся.

Для избежания подобных ошибок необходимо учитывать соответствие результатов гистологических и микроскопических исследований, строго соблюдать все методические требования.

СХЕМА ДИАГНОСТИКИ ВХИ

1.1 Сбор анамнеза на предмет наличия у беременной с неудачно развившейся беременностью предшествующей бактериальной инфекции осуществляется неонатологом, акушером-гинекологом или патологоанатомом на основе анализа «Истории развития ребенка», «Биопсийных карт исследования плаценты», «Протоколов перинатального вскрытия». При наличии в анамнезе симптомов вирусной инфекции врач-специалист направляет секционный материал и образцы плаценты на проведение первичной диагностики (патоморфологические исследования) (рис. 1).

1.2 Первичная диагностика, направленная на обнаружение ВХИ в секционном материале и плаценте, проводится специалистами патологоанатомического бюро и лабораторий учреждения здравоохранения (при наличии соответствующей базы), занимающимися гистологической диагностикой. Рекомендуются использовать гистологический метод (заключается в обнаружении морфологических критериев ВХИ и дифференциации с другой внутриутробной инфекционной патологией) в

сочетании с иммунофлуоресцентным исследованием мазков-отпечатков, приготовленных с нефиксированного секционного материала и/или ткани плаценты и плодных оболочек. При типичной морфологической картине и положительном результате реакции иммунофлуоресценции устанавливается диагноз врожденной хламидийной инфекции с характеристикой органной патологии. При получении положительного результата только одним из методов проводят дополнительные лабораторные исследования методом электронной микроскопии. Отрицательные (сомнительные) данные этих исследований при положительном результате первичной диагностики являются показанием для молекулярно-биологических исследований секционного материала и плаценты.

1.3 Результат первичной гистологической диагностики ВХИ, полученный патологоанатомическим бюро или лабораторией, передается лечащему врачу-специалисту (неонатологу, акушеру-гинекологу). На основании выявленных на этом этапе данных им делается заключение о целесообразности привлечения врача-инфекциониста к ведению пациента. При наличии острых показаний (отсутствие эффекта от проводимой терапии, тяжелое, злокачественное течение заболевания) врачами-специалистами, осуществляющими ведение данного пациента, могут быть рекомендованы микробиологические, серологические и молекулярно-биологические исследования клинического и биопсийного материала урогенитального тракта.

1.4 Забор секционного материала осуществляют патологоанатомические бюро и лаборатории (городские, областные и др.). Забор клинического и биопсийного материала урогенитального тракта производится в лечебных учреждениях, имеющих соответствующую базу (женские консультации, больницы, клиники и др.).

1.5 Секционный материал и образцы плаценты, клинический материал и данные биопсии передаются специалистам лабораторной службы, занимающимся микробиологической, электронно-микроскопической и молекулярно генетической диагностикой. Ими осуществляется детекция антигенов ВХИ и ДНК *C.trachomatis* в текущем секционном и клиническом материале (рис. 1).

1.6 На основании полученных на этом этапе данных патологоанатом может сделать окончательное заключение о наличии ВХИ у погибшего плода и новорожденного. При верификации ВХИ в секционном материале и плаценте лечащий врач-специалист (неонатолог, акушер-гинеколог) может сделать окончательное заключение о наличии у пациента урогенитальной хламидийной инфекции и необходимости проведения соответствующей антихламидийной терапии.



Рис. 1. Схема комплексной диагностики врожденной хламидийной инфекции в секционном материале и плаценте

