

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я

УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

факультет медико-фармацевтичних технологій

кафедра мікробіології, вірусології та імунології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: «УРОГЕНІТАЛЬНИЙ ХЛАМІДІОЗ: МІКРОБІОЛОГІЧНА
ОЦІНКА ПАТОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЗБУДНИКА»**

Виконав: здобувач вищої освіти 2 курс ЛДм22(1,5)-02 групи
224 «Технології медичної діагностики та лікування»
Освітньої програми «Лабораторна діагностика»
Альона АРТЮШЕНКО

Керівник: доцент закладу вищої освіти каф. мікробіології,
вірусології та імунології, к.біол.н., доцент Ірина ТИЩЕНКО

Рецензент: доцент закладу вищої освіти каф. клінічної
фармакології та клінічної фармації,
к.фарм.н., доцент Світлана МІСЮРЬОВА

Харків 2024

АНОТАЦІЯ

Альона АРТЮШЕНКО Урогенітальний хламідіоз: мікробіологічна оцінка патогенних властивостей збудника - Рукопис.

Вивчено патогенні властивості збудника урогенітального хламідіозу і проведено виділення та ідентифікацію хламідій, досліджено їх мікробіологічні властивості: морфофункціональні відмінності, особливості метаболічної активності. Досліджено патогенні особливості лабораторних штамів хламідій. Проаналізовано сучасні методи лабораторної діагностики урогенітальної хламідійної інфекції. Отримані результати можливо використати з метою оптимізації мікробіологічної діагностики урогенітального хламідіозу й створення методичних розробок з дослідження урогенітальної інфекції.

Ключові слова: хламідії, культуральна діагностика, урогенітальний хламідіоз, метаболічна активність, персистування.

Кваліфікаційна робота: вступ, 3 розділи, висновки, список використаних джерел, додатки; загальний обсяг – 63 стор., 3 таблиця, 6 рисунків, 53 використаних джерела літератури.

ABSTRACT

Al'ona ARTYUSHENKO Urogenital chlamydia infection: microbiological evaluation of the pathogenicity of the infectious agent - Manuscript.

The pathogenic properties of the causative agent of urogenital chlamydia were studied, chlamydia were isolated and identified, and their microbiological properties were investigated: morphological and functional differences, features of metabolic activity. The pathogenic features of laboratory strains of chlamydia were investigated. Modern methods of laboratory diagnosis of urogenital chlamydial infection are analyzed. The obtained results can be used to optimize the microbiological diagnosis of urogenital chlamydia and to create methodical developments in the study of urogenital infection.

Key words: chlamydia, cultural diagnosis, urogenital chlamydia, metabolic activity, persistence.

Qualification work: introduction, 3 chapters, conclusions, list of used references, appendices; total volume – 63 pages, 3 table, 6 figures, 53 used references.

Зміст

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ

ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ ... 4

ВСТУП 5

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 8

1.1 Вагінальний біоценоз: сучасні уявлення про норму та патологію..... 8

1.2. Представники порядку Chlamydiales – збудники різних нозологічних форм хламідійної інфекції людини 14

1.3 Сучасні уявлення щодо таксономії та біологічних особливостей мікроорганізмів порядку Chlamydiales 18

1.4. Основні біологічні характеристики *C. trachomatis* 20

1.5. Імунний аспект патогенезу уrogenітального хламідіозу 21

1.6. Клініка уrogenітального хламідіозу 22

1.7. Основні методи діагностики уrogenітального хламідіозу 23

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.... 26

2.1 Об'єкт та матеріал дослідження 26

2.2. Методи дослідження уrogenітального хламідіозу 27

2.2.1. Методи культуральної діагностики 29

2.2.2. Імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA)..... 30

2.2.3. Молекулярно-генетичний метод ідентифікації 31

2.2.4. Метод електронної мікроскопії 31

2.2.5. Статистичний метод оцінки даних 32

РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ

РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ..... 33

3.1. Мікробіологічні особливості хламідій 33

3.1.1. Морфофункціональні відмінності	34
3.1.2. Особливості метаболічної активності.	36
3.2. Сучасні методи лабораторної діагностики урогенітальної хламідійної інфекції.	40
3.3. Характеристика патогенних властивостей лабораторних штамів хламідій.	45
ВИСНОВКИ	52
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	54
ДОДАТКИ	

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ

БВ – бактеріальний вагіноз

КОН – гідроксид калію

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

КУО/м – колоноутворюючі одиниці на мілілітер

РСП – реакція специфічного лейкоцитозу

ЛПС – ліпополісахариди

ЕТ – елементарні тільця

РТ – ретикулярні тільця

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ІФА – імуноферментний аналіз

ПФ – пряма імунофлюорисценція

ЕМ – електронна мікроскопія

ЗЗОМТ – запальні захворювання органів малого таза

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

ВСТУП

Актуальність теми. Серед інфекцій, що передаються статевим шляхом (ПСС), особливе місце займає уrogenітальний хламідіоз (УГХ). Ця хвороба є важливою медикосоціальною проблемою не лише через високу поширеність, а й у зв'язку з великою частотою обумовлених ускладнень та несприятливих наслідків, що негативно впливають на репродуктивне здоров'я нації та демографічні показники. Захворювання вражає чоловіків, жінок, дітей, негативно впливає на репродуктивне здоров'я, може поширюватися на різні органи та системи [11,19].

Щороку у світі на уrogenітальний хламідіоз захворює 92 млн. осіб, що призводить до значних економічних втрат [126]. У США щорічно реєструється понад 5 млн нових випадків захворювання, у Західноєвропейському регіоні — 10 млн. Його частота у популяції серед жінок репродуктивного віку становить 6-8%; частка серед інфекцій, що звернулися до клініки, що передаються статевим шляхом (ПСС), жінок віком до 25 років становить 10-30%, серед чоловіків у віці 15-30 років - 5-10%. Тобто хламідіями можуть бути інфіковані чоловіки та жінки, діти та новонароджені, проте найчастіше їм заражаються люди віком від 16 до 40 років, УГХ страждає майже половина чоловіків і третина жінок [1].

Серед ПСС уrogenітальний хламідіоз займає друге рангове місце після трихомоніазу, значно випереджаючи сифіліс та гонорею. Оскільки ця інфекція часто протікає безсимптомно, то невиявлені бактеріоносії сприяють поширенню захворювання у суспільстві. [30,45, 54,137].

УГХ нерідко є причиною розвитку хронічних запальних захворювань органів порожнини малого тазу, що є ризиком розвитку гнійно-септичних ускладнень, синдрому хронічного тазового болю, позаматкової вагітності, безпліддя, невдалих спроб під час проведення програм допоміжної репродукції, збільшення частоти внутриутробного інфікування плода. Запальний процес, зумовлений хламідіями, нерідко корелює з появою ендометріюїдних гетеротопій у стінці матки, черевній порожнині, яєчниках та інших локусах.

У розвинених країнах урогенітальні інфекції хламідійної етіології та їх ускладнення прямо пов'язані з *Chlamydia trachomatis* (*C. Trachomatis*) [126].

В останні роки *C. trachomatis* відведено важливу роль у розвитку передраку та раку шийки матки, а також передачі ВІЛ-інфекції. Саме *C. trachomatis* визнана тригерним агентом хвороби Рейтера - важкого аутоімунного захворювання, найчастішою причиною ураження суглобів у чоловіків сексуально активного віку.

Сьогодні існують певні складності з своєчасною діагностикою УГХ. Проблеми ідентифікації збудника урогенітального хламідіозу пов'язані з цілим рядом обставин: наявністю поєднаних (хламідійно-уреаплазмових, хламідійно-гонококових, хламідійно-трихомонадних та інших) інфекцій, що передаються статевим шляхом, а також можливістю існування латентних чи персистентних форм. Ці форми виникають внаслідок порушення життєвого циклу хламідій на різних фазах. Латентні форми хламідій спостерігаються при інгібуванні життєвого циклу на стадії елементарних тілець (ЕТ, інфекційні, метаболічно неактивні форми), при неможливості вступу до нового циклу розвитку (всередині клітин-мішеней). Інгібування переходу внутрішньоклітинних ретикулярних тілець (РТ, вегетативні реплікативні форми) в елементарні тільця призводить до персистування атипових включень з ретикулярними тільцями, що діляться, хламідій. При цьому відзначається зміна (зниження) чутливості до антибіотиків. Існування персистентних форм ускладнює діагностику урогенітального хламідіозу та потребує комплексного підходу до лабораторного обстеження пацієнтів з урахуванням давності захворювання та наявності симптоматики.

Урогенітальний хламідіоз досі продовжує залишатися серйозною медичною проблемою. У жодному із розділів її вивчення точка не поставлена. Актуальними залишаються дослідження патогенних властивостей хламідій для подальшого визначення оптимальних методів діагностики та лікування. Залишається важливим питання розширення груп хворих, які підлягають обстеженню на хламідії та визначенню клінічних особливостей перебігу УГХ у кожній з них. До цього часу уточнюються деякі аспекти патогенезу

захворювання. Вирішуються питання підходу до діагностики хламідійної інфекції, пошуку найбільш ефективних методик або їх комплексу, змінюються поняття «золотого» та «розширеного золотого» стандартів діагностики.

Мета дослідження. Метою нашої роботи є вивчення патогенних властивостей збудника уrogenітального хламідіозу і його мікробіологічна оцінка.

Виходячи з поставленої мети основними **завданнями дослідження** є наступні:

- Провести виділення та ідентифікацію хламідій.
- Охарактеризувати мікробіологічні властивості хламідій.
- Дослідити морфофункціональні відмінності хламідій.
- Визначити особливості метаболічної активності хламідій.
- Проаналізувати сучасні методи лабораторної діагностики уrogenітальної хламідійної інфекції.
- Виявити патогенні властивості лабораторних штамів хламідій.

Об'єктом дослідження є мікробіологічна оцінка патогенних властивостей збудника уrogenітального хламідіозу.

Предметом дослідження є патогенні властивості збудника уrogenітального хламідіозу.

Методи дослідження: методи культуральної діагностики, імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA), молекулярно-генетичний метод ідентифікації, метод електронної мікроскопії, статистичний метод оцінки даних.

Практичне значення отриманих результатів: проведено мікробіологічну діагностику збудника уrogenітального хламідіозу і досліджено його патогенні властивості.

Отримані результати можливо використати з метою оптимізації мікробіологічної діагностики уrogenітального хламідіозу й створення методичних розробок з дослідження уrogenітальної інфекції.

Апробація результатів дослідження і публікації: Основні наукові положення дисертації доповідались та обговорювались на I Науково-практичній дистанційній конференції «Сучасна антимікробна терапія:

проблеми та шляхи вдосконалення» (17 листопада 2023 року, м. Харків); на Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «YOUTH PHARMACY SCIENCE» (6–7 грудня 2023 рік, м. Харків).

Публікації:

1. Урогенітальний хламідіоз: мікробіологічна оцінка патогенних властивостей збудника / Артюшенко А.М., Тіщенко І.Ю., Місюрьова С.В., Кошова О.Ю., Шаповалова О.В. // Сучасна антимікробна терапія: проблеми та шляхи вдосконалення: Матеріали І Науково-практичної дистанційної конференції (17 листопада 2023 року, м. Харків). – Х.: НФаУ, 2023. – с. 56-58.
2. Структура та обсяг кваліфікаційної роботи: Робота викладена на 60 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 6 рисунком та 3 таблицею; складається зі вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел, що включає роботи 11 вітчизняних та 42 закордонних авторів.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Вагінальний біоценоз: сучасні уявлення про норму та патологію.

Біоценоз піхви - це мікроекосистема, особливості якої визначаються не тільки мікрофлорою піхви, а й анатомічною будовою, гістологічною структурою слизової оболонки, біологічними властивостями вагінальної рідини (Радзінський В.Е., Ордіанц І.М. , 2006). Відомо, що слизова оболонка піхви вкрита багат шаровим плоским неороговілим епітелієм без залоз, що

складається з кількох шарів клітин: базального, парабазального, проміжного і поверхневого. При цитолізі поверхневих клітин глікоген вивільняється з цитоплазми і стає живильним субстратом для енергетичних і пластичних процесів нормальної мікрофлори піхви (Kira E.F., 2001). Як відомо, нормальну мікрофлору піхви поділяють на облігатну, факультативну і транзиторну. До його складу обов'язково входять облігатні мікроорганізми, що перешкоджають розвитку хвороботворних мікробів, що потрапили в піхву. У здорових жінок досить часто зустрічаються представники факультативних мікроорганізмів (непатогенних і умовно-патогенних). Транзиторні мікроорганізми (непатогенні, умовно-патогенні та патогенні) випадково потрапляють у статеві шляхи із зовнішнього середовища. В умовах нормального біотопу вони перебувають у піхві недовго і швидко видаляються з потоком слизу та за рахунок діяльності мукоциліарного епітелію. При порушенні захисних механізмів патогенні або умовно-патогенні мікроорганізми транзиторної або факультативної флори прикріплюються до клітин вагінального епітелію (адгезія) з подальшим розмноженням і пошкодженням тканин, що призводить до розвитку запальної реакції.

Основними представниками облігатної мікрофлори піхви жінок репродуктивного віку є лактобактерії (загальновідомі палички Дедерлейна). Вони відіграють важливу роль у підтримці нормального біоценозу піхви завдяки високій конкуренції та антагонізму по відношенню до більшості патогенних і умовно-патогенних бактерій. Лактобактерії метаболізують глікоген до глюкози і молочної кислоти, що підтримує кислу реакцію вагінального вмісту (рН 3,8-4,4), необхідну для росту самих лактобактерій. Типи молочнокислих бактерій (*Lactobacillus*), отримані з вагінальних зразків здорових жінок, включають *L. acidophilus*, *L. jensenii*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. brevis* і *L. salivarius*. Найбільш поширені мікроаерофільні види, які продукують перекис водню, рідше зустрічаються анаеробні види лактобацил. Особливе значення в підтримці нормального мікробіоценозу піхви мають лактобактерії, які продукують перекис водню, їх кількість у піхві в нормі становить 105-109 КУО/мл. Саме перекис водню, що виробляється

лактобактеріями, разом з пероксидазою цервікального слизу і сполуками гало пригнічує розмноження багатьох патогенних мікроорганізмів.

Захисні властивості ендогенної мікрофлори піхви реалізуються за допомогою таких механізмів (Kira E.F., 2001):

- блокування рецепторів адгезії для чужорідних мікроорганізмів;
- конкуренція з екзогенною інфекцією за харчові речовини;
- стимуляція рухливості епітелію слизового шару піхви та процесу його оновлення на поверхні клітин;
- виробництво жирних кислот, пероксидів і бактеріоцидів;
- індукція імунної відповіді проти патогенних мікроорганізмів, продукція стимуляторів імуногенезу та активаторів фагоцитарної та ферментативної активності.

Супутня мікрофлора представлена переважно аеробними, факультативно-анаеробними та строго анаеробними мікроорганізмами. Використання сучасних молекулярно-генетичних методів ідентифікації збудників дає змогу виявити у піхві здорової жінки понад 300 видів мікроорганізмів.

Дослідження вітчизняних і зарубіжних авторів показали, що у деяких жінок нормальна мікрофлора зберігається навіть за відсутності лактобактерій. Домінуючим мікроорганізмом у мікрофлорі можуть бути бактерії *Atorobium*, *Megasphaera* і *Leptotrichia*, які є продуцентами молочної кислоти, а також *Lactobacillus*. Це можливо при зниженні частки лактобактерій у мікрофлорі піхви з будь-яких причин. При цьому свою нішу в мікробіоценозі піхви займають інші бактерії, що виробляють лактат.

До складу нормальної мікрофлори піхви також можуть входити стафілококи, мікоплазми, коринебактерії, стрептококи, пептострептококи, гарднерели, бактероїди, ентерококи, ентеробактерії, вейлонелли і біфідобактерії, а також дріжджові гриби *Candida*. Однак загальна питома вага цих мікроорганізмів не повинна перевищувати 5-8%.

Для оцінки стану мікрофлори піхви О.Ф. Кіра (2012) розробила класифікацію вагінального біоценозу, в якій подано мікроскопічну характеристику чотирьох типів біоценозу, що відповідають основним нозологічним формам.

Перший тип — нормоценоз, який характеризується домінуванням лактобактерій, відсутністю грамнегативної мікрофлори, спор і міцелію дріжджоподібних грибів, наявністю поодиноких лейкоцитів і «чистих» епітеліальних клітин. Подібна картина відображає типовий стан нормального біотопу вагіни.

II - проміжний тип - помірна або знижена кількість лактобацил, наявність грампозитивних коків, грамнегативних паличок. Виявляються лейкоцити, моноцити, макрофаги, епітеліальні клітини. Це прикордонний тип, часто спостерігається у здорових жінок, рідко супроводжується скаргами та клінічними проявами.

III тип – дисбактеріоз піхви, що виражається в невеликій кількості або повній відсутності лактобактерій, рясні поліморфні грамнегативні та грампозитивні палички та кокова мікрофлора, наявність «ключових клітин». Кількість лейкоцитів варіабельна, відзначається відсутність або незавершеність фагоцитозу. Відповідає мікробіологічній картині БВ.

IV – вагініт (запальний тип мазка) – полімікробна картина мазка з великою кількістю лейкоцитів, макрофагів, епітеліальних клітин, виражений фагоцитоз.

На склад мікрофлори піхви, як якісно, так і кількісно, можуть впливати особливості туалету статевих органів, ступінь статевої активності, а також різні методи контрацепції. Зниження концентрації лактобактерій відбувається при застосуванні внутрішньоматкових контрацептивів, антибіотиків, інших антибактеріальних засобів, після хірургічних втручань, під час гормонального стресу після абортів, при наявності пухлинних процесів тощо. Проблема, пов'язана із застосуванням антибіотиків, які результати в ряді випадків заслуговує на особливу увагу. Необхідність застосування даного виду препаратів для усунення однієї інфекції призводить до посилення дисбактеріозу і зростання інших збудників.

Особливо гостро стоїть проблема дисбактеріозу піхви під час вагітності, оскільки він істотно впливає на здоров'я і мікрофлору новонародженого, а також в післяпологовий період у матері. Поглиблене вивчення порушень вагінальної мікрофлори в акушерській практиці показало, що найбільший ризик розвитку

інфекційно-запальних ускладнень у жінок під час пологів і післяпологового періоду спостерігається у вагітних з порушенням мікробіоценозу піхви. У ряді досліджень встановлено, що під час вагітності збільшується частота народження умовно-патогенних мікроорганізмів: патогенна і умовно-патогенна флора до кінця гестації становить до 51,4%, а частота порушень мікробіоценозу родових шляхів у жінок групи ризику акушерської патології під час вагітності в середньому в 40-65%. Значний вплив на гестаційний процес має мікрофлора піхви: у багатьох вагітних із затримкою внутрішньоутробного розвитку виявляли БВ у поєднанні з інфекціями, що передаються статевим шляхом. Внутрішньоутробна інфекція є одним із важливих факторів, наявністю якого можна пояснити генез 25-40% передчасних пологів, які є основною причиною неонатальної смертності у світі. Низка наукових робіт вказує на потенційний зв'язок між спектром бактерій, виявлених в амніотичній рідині, та мікробіотою піхви - постійного резервуару та потенційного джерела інфекції.

В даний час епідеміологія BV залишається неясною. За даними Л. В. Кудрявцевої та ін. (2001), висока частота виявлення *G. vaginalis* у здорових жінок і навіть у дітей дозволяє вважати ці мікроорганізми складовою нормальної мікрофлори піхви. На користь ендogenous походження БВ свідчить висока частота виявлення *G. vaginalis* з розвитком відповідної клінічної симптоматики при застосуванні внутрішньоматкових систем і оральних контрацептивів у вагітних, післяпологовому, післяабортному та клімактеричному періодах.

З іншого боку, на користь статевих шляхів передачі БВ свідчать такі фактори: одночасне виділення *G. vaginalis* із статевих шляхів хворих на БВ жінок та їх статевих партнерів; висока частота повторних інфекцій у вилікуваних жінок, партнери яких не проходили лікування одночасно; достовірні випадки БВ у жінок після статевих контактів з чоловіками-носіями *G. vaginalis*.

Діагностика БВ ґрунтується на результатах клініко-лабораторного обстеження. Основним симптомом цього стану є скарги на виділення з неприємним запахом (у 50-87% хворих). Виділення частіше помірні, рідше рясні, іноді відсутні зовсім. Характер виділень при БВ: сірувато-білі, однорідні, без грудочок, мають специфічний запах, який може бути постійним, з'являтися під час менструації

або статевому акту, іноді взагалі не з'являтися. Тривалість збереження цих симптомів може обчислюватися роками.

При тривалому процесі виділення набувають жовтувато-зелений колір, стають густішими, мають властивість пінитися, злегка в'язкі і липкі, рівномірно розподіляються по стінках піхви. Скарги на свербіж і дизуричні явища рідко або виникають періодично. Найчастіше у жінок з БВ відзначають гіперполіменорею, хронічні запальні захворювання придатків матки. Рідко спостерігаються явища вульвіта і кольпіту зі скаргами на свербіж (їх наявність зазвичай характерна для трихомоніазу і кандидозу). Деякі пацієнти з БВ не мають жодних суб'єктивних або об'єктивних симптомів.

Діагноз БВ може бути встановлений за наявності принаймні трьох з чотирьох об'єктивних ознак: специфічний характер виділень, наявність «ключових клітин» при мікроскопічному дослідженні, рН вагінальної рідини $> 4,5$ (в середньому 5-6), позитивний амінотест: характерний запах вагінальних виділень до або після додавання 10% розчину КОН.

Е.Ф. Кіра (1999) рекомендує в якості додаткового критерію діагностики БВ вважати невдалу попередню терапію вагініту антибіотиками та протизапальними засобами.

Наявність «ключових клітин» у мазках вагінального вмісту, пофарбованих за Грамом, є однією з ознак БВ. Вони являють собою вагінальні епітеліальні клітини, вкриті грамнегативними паличками, і виявляються у 94% пацієнток, тоді як у здорових жінок вони не виявляються незалежно від віку.

Складність бактеріологічної діагностики БВ насамперед характеризується відсутністю якогось одного конкретного етіологічного збудника та залученням до процесу умовно-патогенних анаеробних бактерій. Водночас ці мікроорганізми в недомінуючих кількостях можуть бути присутніми в мікроекосистемі піхви здорових жінок; наприклад, *G. vaginalis*, *Bacteroides* spp., *Mobiluncus* та ін., досить часто виділяють в осіб, які не мають скарг і клінічної картини запального процесу.

Крім того, існують певні труднощі при культивуванні анаеробів в лабораторних умовах і оцінці їх чутливості до антибіотиків (тривалість культивування,

використання спеціальних поживних середовищ, виділення чистих культур із змішаних популяцій). Тому дуже часто за наявності характерних симптомів БВ лікування похідними нітроїмідазолу, зокрема метронідазолом, призначають лише на підставі результатів мікроскопічного дослідження. Однак такий підхід не завжди себе виправдовує, що проявляється в неефективності лікування або в рецидивах захворювання. Враховуючи відому чутливість анаеробних бактерій до метронідазолу, причина таких «збоїв» у лікуванні БВ залишилася неясною. Мікроорганізм *Atorobium vaginae* родини *Corinobacteriaceae*, який є збудником БВ, на думку деяких авторів, є більш специфічним маркером захворювання, ніж *G. vaginalis*.

Увагу дослідників звернув той факт, що наявність цього мікроорганізму в асоціації з іншими анаеробними захворюваннями набагато легше піддається лікуванню метронідазолом. Так, після курсу антибактеріальної терапії рецидиви захворювання, спричиненого асоціацією *G. vaginalis* і *A. vaginae*, спостерігалися у 83 % хворих, а при моноінфекції (*G. vaginalis*) – лише у 38 %. Пізніше було доведено, що більшість досліджених штамів *A. vaginae* характеризуються високим рівнем стійкості до метронідазолу.

1.2. Представники порядку Chlamydiales – збудники різних нозологічних форм хламідійної інфекції людини

Сучасні багатовекторні дослідження біологічних, генетичних, етіопатогенних особливостей хламідій різних видів привертають все більшу увагу фахівців різних галузей медичної науки та закладів охорони здоров'я у зв'язку з широким спектром патологічних станів і клініко-епідеміологічних проявів інфекції, перелік яких за останні роки значно розширено. Щорічно у світі реєструється близько 100 млн хворих на уrogenітальний хламідіоз. Вважається, що кількість хворих на хламідійну інфекцію у світі досягає від 500 мільйонів до 1 мільярда. За даними CDC, частота реєстрації уrogenітального хламідіозу в США у 2005 р. становила 332,5 на 100 тис. населення. Кількість щорічно зареєстрованих випадків інфікування на 100 тис. населення в Україні досягає 70,2, а інтенсивний рівень захворюваності за середніми даними для Російської Федерації становить

97,2. Наведені вище статистичні дані не відображають фактичної поширеності хламідійної інфекції в загальній популяції, оскільки широкомасштабних досліджень поширеності небагато, а статистичні дані неповні. Патологічні прояви хламідійної інфекції дуже різноманітні, спектр захворювань, викликаних хламідіями, досить широкий. Хламідіози у людини проявляються системними сечостатевими, респіраторними, суглобовими, неврологічними, офтальмологічними, серцево-судинними, а також генералізованими захворюваннями. Хламідіози спостерігаються у формі гострих, хронічних і латентних інфекцій, часто змінюючи їх характер при взаємодії мікро- і макроорганізму. Тривала персистенція в організмі хазяїна дуже характерна для хламідій, потенційно небезпечних неконтрольованою реактивацією інфекції. Тривалий час, на початку вивчення інфекції, основна увага медичних фахівців була зосереджена на одній формі офтальмопатології, ендемічній трахомі, яка є основною причиною набутої сліпоти у світі, а на даний момент є гіперендемічним захворюванням країн третього світу. Визнаними факторами поширення інфекції серед населення є недотримання правил особистої гігієни, відсутність своєчасного специфічного лікування та трансмісивна роль мух як переносників інфекції. Вважається, що в світі налічується не менше 6 мільйонів людей, які втратили зір внаслідок трахоми. Результати дослідження урогенітальних форм хламідійної інфекції свідчать про те, що їхнє значення для суспільної медицини зростатиме, оскільки адекватні методи лабораторної діагностики цієї патології, яка має глобальне поширення та є серйозною проблемою охорони здоров'я через ураження збудником репродуктивних органів системи, впроваджуються в практику, іноді призводить до безпліддя, викликає позаматкову вагітність або ускладнює перебіг вагітності. Хламідійна інфекція під час вагітності підвищує ризик перинатальної смертності новонароджених, спричиняє інфікування новонароджених під час пологів і розвиток важких захворювань у немовлят і дітей. Клінічно хламідійна інфекція у дітей проявляється не тільки ознаками патології сечостатевої системи, а й екстрагенітальними вогнищами інфекції. Спостерігаються ураження очей, інших органів (риніт, назофарингіт, євстахіаніт, отит), а також більш важкі

ураження дихальної системи. Велике значення у розвитку пієлонефриту у дітей має висхідна інфекція. У літературі є повідомлення про дослідження захворювань ЦНС, асоційованих з хламідійною інфекцією. З широке розповсюдження уrogenітального хламідіозу пов'язане з природним розвитком • екстрагенітальних форм хламідійної інфекції. Встановлено етіопатогенетичний зв'язок хламідіозу з деякими проявами артрологічної патології зв'язок (уретроокулосиновіальний синдром Рейтера, реактивний артрит), що підтверджує можливість гематогенної дисемінації збудника. Доведено роль хламідій у виникненні пельвіоперитоніту та перигепатиту. У ряді країн світу частіше зустрічається хламідійна венерична лімфогранульома з переважанням ураження лімфоїдної тканини, яке раніше вважалося екзотичним захворюванням. Це захворювання широко поширене в країнах з вологим і теплим кліматом, в Європі і США захворюваність становить 0,1 на 100 тис. населення. Генералізація інфекції викликає важкі ураження нервової системи, серця, легенів, шкіри, очей та інших органів.

Частота діагностичного виділення збудника у залежності від виду біологічного матеріалу та клінічного діагнозу.

Клінічна діагностика	Вид зрзка	Кількість зразків	Позитивні знахідки
Хронічний уретрит	Зішкряби із уретри	16	12
Хронічний простатит		11	8
Хвороба Рейтера		26	12
Хронічний ендocerвіцит		5	3
Хронічний ендocerвіцит	Зішкряби з цервіксу	15	8
	Кондиломи	10	4
Хронічний простатит	Сік простати	25	11
Хвороба Рейтера	Суглобова рідин	15	3
Реактивний артрит		16	5
Хронічний сіновіт		6	3

Вагітні з хламідійною інфекцією	Навколоплідні води	23	8
Породілля з обстеженим анамнезом	Плацента	21	6
Хвороба Рейтера	Зішкряб з кон'юнктиви	8	2
Пневмонія	Мокротиння	5	3
Запальні хвороби дихальних шляхів	Назофарінгеальні зрзки	15	4
Атеросклероз судин, ішемічна хвороба серця	Атеросклеротична бляшка	7	4
	Загальна кількість	224	96(42,9%)

Частота отримання лабораторних ізолятів хламідій з первинно вичлених чистих культур мікроорганізму.

Вид клінічного матеріалу	Кіль-Кість зразків	Позитив-Ний результат	Бактері-альна контамі-нація	Вичленення Чистої культури	Отримані ізоляти
Зішкрябний матері-ал з уретри	58	35 (60,3%)	9	26 (74,3%)	15 (57,7%)
Зішкрябний мате-ріал з цервіклього каналу	15	8 (53,3%)	3	5 (62,5%)	2 (40%)
Навколоплідні води	23	8 (34,8%)	1	2 (8,7%)	-
Плацента	21	6 (28,6%)	4	2 (9,5%)	-

Усього	117	57	17	35	17
--------	-----	----	----	----	----

1.3 Сучасні уявлення щодо таксономії та біологічних особливостей мікроорганізмів порядку Chlamydiales

Унікальний цикл розвитку представників Chlamydiales визначає їх унікальність і відмінність від інших представників мікрмасштабу і зумовлює таксономічне положення в системі мікроорганізмів на рівні самостійного порядку. Своєрідність біологічних властивостей мікроорганізму постійно викликала дискусію щодо таксономічної класифікації, яка ґрунтувалася на аналізі індивідуальних фенотипових, культуральних і морфологічних ознак на видовому рівні. Застосування сучасних молекулярно-біологічних методів дозволило виявити нові мікроорганізми з характерним для хламідій циклом розвитку. Визначення геному вже відомих видів збудника за допомогою методів рестрикції та молекулярної гібридизації, а також за результатами філогенетичного аналізу призвів до необхідності перегляду класифікації мікроорганізмів цього порядку. Хоча слід зазначити, що не всі вчені в галузі хламідіології згодні з перекласифікацією, а саме зі змінами в родині Chlamydiaceae. На 4-му Європейському конгресі «Chlamydia-2000» (Гельсінкі, 2000) була прийнята нова міжнародна класифікація хламідій, яка базується на наявності понад 95% гомології в нуклеотидній послідовності генів 16S і 23S рРНК для всіх представників роду і понад 90% сімейства. з новим визначенням, запропонованим Everett K.D.E., «в порядку Chlamydiales об'єднані облигатні внутрішньоклітинні бактерії, які мають хламідійний цикл розвитку, характеризуються наявністю грампозитивних або грамнегативних елементарних тілець (ET) і мають більше ніж 80% гомології послідовності на 16S і 23S генах рРНК». Класифікація також заснована на порівняльному філогенетичному аналізі 5 структурних генів, що кодують ферменти GroEL і KDO-трансферази, основний білок зовнішньої мембрани MOMP і ліпопротеїн.

Порядок Chlamydiales розділили на 4 родини, кожна з яких має свою екологічну нішу. Раніше некласифіковані мікроорганізми об'єднували в Parachlamydiaceae,

Simkaniaceae, *Waddliaceae*, а зараз проводяться інтенсивні дослідження, спрямовані на визначення ролі та подальшу ідентифікацію представників цих родин у різних екопопуляціях [130]. Найбільш радикальні зміни відбулися в систематиці родини *Chlamydiaceae*, яка поділяється на 2 роди *Chlamydia* та *Chlamydophila*, що відрізняються один від одного за фенотипічними та екологічними ознаками.

Мікроорганізми ряду *Chlamydiales* — високоспеціалізовані грамнегативні внутрішньоклітинні паразити еукаріотів, які характеризуються облігатним внутрішньоклітинним існуванням і унікальним двофазним життєвим циклом з конверсією між двома морфологічно і функціонально дискретними формами: ретикулярною (RT) і елементарною (ET) тіла [96]. Цикл розмноження хламідій реалізується при їх взаємодії з чутливою клітиною господаря. Основний цикл включає такі стадії: адсорбція та інтерналізація ET; диференціація ET в RT; ремоделювання паразитофорної вакуолі та розмноження бактерій; розширення включення та перетворення RT в ET; вивільнення бактерій із клітини-господаря та інфікування нових клітин-мішеней [186]. Інфекційний процес починається з високоспеціалізованої стадії адсорбції ET на специфічних ділянках на поверхні еукаріотичних клітин за допомогою життєво необхідного для паразита процесу взаємодії рецептор-ліганд. де глікозрамінглікан виступає сполучною ланкою між поверхневими білками хламідій (MOMP або OtsB) і комплементарним рецептором на поверхні клітини-хазяїна, в результаті чого утворюється тримолекулярна сендвіч-структура.

Останнім часом увага дослідників спрямована на визначення ролі факторів вірулентності в патогенезі хламідійної інфекції та їх зв'язку з розвитком і тяжкістю захворювань, спричинених хламідіями. Поліморфні білки зовнішньої мембрани (EPP), ефектори секреції типу 3, білки реакції на тепловий шок і стрес (Hsp), передбачувані цитотоксини та криптичні плазмідні регуляторні фактори вважаються ключовими ідентифікованими факторами.

Гени поліморфних білків зовнішньої мембрани (*omp*) нещодавно були визнані потенційно важливими факторами вірулентності хламідій у модуляції

запалення. Геном *C. trachomatis* включає 9, *C. pneumoniae*-21 і *C. psittaci* - 5 генів *rmp*. Усе сімейство з 9 генів становить приблизно 14% усієї системи кодування *S. trachomatis*. Функції білків *rtr* у хламідій до кінця не визначені. Хламідійні *rmpB*, *D*, *H* є суворими імуногенами та викликають прозапальні цитокінові реакції.

1.4. Основні біологічні характеристики *C. trachomatis*

Хламідіозом можна заразитися як від людини, так і від тварини. Найнебезпечнішими видами хламідій є *Chlamydia psittaci* і *Chlamydia pecorum*, які потрапляють в організм людини при контакті з хворими тваринами і птахами, а також *Chlamydia trachomatis* і *Chlamydia pneumoniae*, які передаються від хворої людини. У зовнішньому середовищі хламідії стійкі 36-48 годин, гинуть при кип'ятінні протягом 1 хвилини і після обробки антисептиками (спирт, розчини хлору високої концентрації, розчини перекису водню і перманганату калію). Захворювання, викликані хламідіями, називають хламідіозом. Захворювання, викликані *C. trachomatis* і *C. pneumoniae*, є антропонозами. Орнітоз, збудником якого є *S. psittaci*, є зооносною інфекцією.

Морфологія хламідій: дрібні, грам «-» бактерії, сферичної форми. Вони не утворюють спор, відсутні джгутики і коробочки. Клітинна стінка: 2-шарова мембрана. Вони мають гліколіпіди. За Грамом - червоний колір. Основний спосіб фарбування - за Романовським - Гімза.

2 форми існування: елементарні тільця (неактивні інфекційні частинки, поза клітиною); ретикулярні тільця (всередині клітин, вегетативна форма). Культивування: можна розмножувати тільки в живих клітинах. У жовтковому мішку курячих ембріонів, організмі чутливих тварин і в культурі клітин. Ферментативна активність: мала. Вони зброджують піровиноградну кислоту, синтезують ліпіди. Вони не здатні синтезувати високоенергетичні сполуки. Антигенна структура: Антигени трьох типів: родоспецифічний термостабільний ліпополісахарид (в клітинній стінці). Виявлено за допомогою RSC; видоспецифічний білковий антиген (у зовнішній мембрані). Виявлено за

допомогою RIF; варіантспецифічний антиген білкової природи. Фактори патогенності. Їх адгезивні властивості пов'язані з білками зовнішньої оболонки хламідій. Ці адгезини містяться тільки в елементарних тілах. Хламідії виробляють ендотоксин. Білок теплового шоку, здатний викликати аутоімунні реакції, був виявлений у деяких хламідіях. Висока до різних факторів зовнішнього середовища. Стійкий до низьких температур, висихання. Чутливий до тепла. *S. trachomatis* є збудником захворювань сечостатевої системи, очей і дихальних шляхів людини.

1.5. Імунний аспект патогенезу уrogenітального хламідіозу

Основним аспектом патогенезу уrogenітального хламідіозу є повільно прогресуючий процес рубцювання:

1. порушення трансендотеліального бар'єру і мікроциркуляції;
2. втрата ворсинчастих клітин;
3. стаз і крайовий стан тромбоцитів;
4. ураження цитопемії;
5. гіпоксія і набряк тканин.

В результаті посиленого синтезу колагену і проліферації фіброblastів утворюється рубцева тканина, що призводить до спайкового процесу в малому тазу, позаматкової вагітності або трубного безпліддя.

У період розмноження хламідій з інфікованих клітин виділяються гідролітичні лізосомальні ферменти, які створюють токсичну дію продуктами автолізу зруйнованих клітин.

Внаслідок патогенної дії мікроорганізмів на хламідії в тканинах розвивається патологічний процес, який проявляється на рівні загальних і місцевих комплексних і захисних реакцій.

На місці первинного ураження:

1. спостерігається лімфоїдна субепітеліальна інфільтрація;
2. розвивається набряк і гіперемія слизових оболонок;
3. порушується цілісність епітелію з частковою десквамацією епітеліального шару;

4. утворюється запальний ексудат;
5. розвиваються функціональні порушення.

Ступінь вираженості запалення, локалізація процесу, тривалість патології, наслідки патологічних процесів визначають клінічну картину захворювання, показують форму інфекційного процесу, характер перебігу захворювання.

Основним шляхом захоплення нових тканин є послідовне пошкодження епітелію слизової оболонки сечостатевої системи при трансканулярному висхідному поширенні інфекції.

1.6. Клініка урогенітального хламідіозу

Від моменту зараження до розвитку клінічної картини проходить від 1 тижня до кількох місяців (зазвичай 1-3 тижні). На думку І.І. Ільїна середня тривалість інкубаційного періоду становила 206 ± 105 днів. Продромальні явища, такі як незначні парестезії, спостерігаються дуже рідко.

Суб'єктивні розлади, які мало турбують хворих, виникають лише при появі відокремленого.

Відмінною рисою хламідійної інфекції є переважно безсимптомний, рідше слабосимптомний перебіг. У вітчизняній практиці прийнято вважати свіжу (до 2 місяців) і хронічну (більше 2 місяців) інфекцію. У свою чергу, свіжий поділяється на гострий (практично не діагностується), підгострий, торпідний. Симптоми в основному викликані уретритом у чоловіків і цервіцитом у жінок.

При зборі анамнезу та огляді чоловіків можуть відзначатися мізерні виділення з уретри, в рідкісних випадках біль при сечовипусканні, іноді дискомфорт, печіння, свербіж в уретрі.

У жінок відзначаються виділення з піхви, хворобливі відчуття при сечовипусканні, кров'янисті виділення з піхви в середині екстреного циклу або після статевого акту, болі внизу живота.

При розвитку патологічного процесу симптоми обумовлені ускладненнями захворювання. Так, Бергер Р.Е. відзначили значну роль хламідій у розвитку

епідидиміту у чоловіків молодого віку. Інші часті ускладнення УГГ у чоловіків включають орхоепідидиміт, геморагічний цистит і стриктури уретри. Найбільшу роль у розвитку простатиту відіграє змішана інфекція.

Хламідійна інфекція у жінок не тільки викликає важкий перебіг патології нижніх відділів сечостатевого тракту, але часто супроводжується розвитком висхідної та дисемінованої інфекції, виникненням запальних захворювань органів малого таза, розвитком безпліддя, інфікуванням новонароджених і статевих партнерів. Найчастіше інфікується шийка матки, звідки процес поширюється на уретру, матку, маткові труби, внутрішні органи.

Хламідії не тільки викликають гіпертрофію слизової оболонки шийки матки, але можуть призвести до розвитку фолікулярного ендоцервіциту і навіть некротизованої гранульоми шийки матки, викликана хламідіями гіперплазія епітелію може призвести до розвитку пухлин шийки матки.

Найчастішим ускладненням хламідійної урогенітальної інфекції є ендометрит. Зазвичай розглядається як проміжна стадія висхідної інфекції (гострий ендометрит, який супроводжується утворення лімфоїдних фолікулів при хламідійному ендометриті спостерігається значно частіше, ніж при нехламідійному.

1.7. Основні методи діагностики урогенітального хламідіозу

Цитоскопічні методи. При цитоскопічному методі одночасно з пошуком цитоплазматичних клітин-включень Гальбершедтера-Провачека враховується кількість лейкоцитів як показника запалення, а також додаткова інформація про наявність супутньої бактеріальної мікрофлори, дріжджоподібних грибів, трихомонад тощо. Цитоскопічний метод широко доступний, але ефективний лише при гострих формах інфекції, значно менш ефективний та інформативний при хронічних формах захворювання.

Імуноморфологічні методи. Ці методи ґрунтуються на виявленні антигенних субстанцій хламідій в епітелії та інших тканинах шляхом обробки препаратів антитілами. Антитіла діагностичної антихламідійної сироватки з'єднані з якоюсь

міткою - люмінесцентною (ФІТЦ-антитіла) або ферментною (ензим-мічені антитіла).

Пряма імунофлюоресценція (ПФ). Цей метод передбачає пряме виявлення антигенів хламідій. При люмінесцентній мікроскопії хламідійні включення визначаються у вигляді утворень у клітині епітелію із зеленою або жовто-зеленою флюоресценцією на коричнево-жовтогарячому фоні цитоплазми клітин. Включення можуть мати зернисту, гомогенну або змішану структуру. Діагностична інформативність ПФ пов'язана з тим, що з її допомогою виявляються не тільки корпускулярні, але й антигени розчинні хламідій.

Непрямий метод імунофлюоресценції. Непрямий метод імунофлюоресценції застосовують у тих випадках, коли немає в наявності ФІТЦ-кон'югату антихламідійних антитіл. У цих випадках приготовлений тим же методом, що і для ПФ препарат з клінічних проб спочатку обробляють антихламідійними антитілами, отриманими шляхом імунізації хламідіями овець, кроликів, мишей або інших тварин, а потім другою сироваткою, специфічною для виду тварини, яка була імунізована хламідіями. Антитіла другої сироватки кон'юговані з ФІТЦ.

Висновки до розділу 1

Таким чином, аналіз літературних джерел щодо сучасних уявлень відносно біологічних властивостей унікальних внутрішньоклітинних паразитів порядку Chlamidiales демонструє, що дані патогени є динамічною системою мікроорганізмів з широким спектром фенотипових ознак, які не завжди стабільні в межах одного виду. Виявлено існування мутантних штамів, які мають підвищену патогенність. Надзвичайно важливі дослідження, що спрямовані на встановлення взаємозв'язку вірулентних властивостей штамів і особливостей перебігу захворювання. Особливе місце займає удосконалення мікробіологічного дослідження вилучених ізолятів з різноманітного біоматеріалу.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об'єкт та матеріал дослідження

Хламідії викликають широкий спектр захворювань, що визначає вибір клінічного матеріалу для дослідження в залежності від вогнища ураження. Збір первинного матеріалу для культурологічних досліджень проводився від хворих з різними проявами захворювань у медичних установах міста Харкова. Для транспортування клінічних зразків використовували середовище 199 з 10% ETS, 5% 40мМ розчином глюкози, 100 мкг/мл гентаміцину, 150 мкг/мл ванкоміцину та 2,5 мкг/мл амфотерицину. [1,2]. Культуральні дослідження отриманих клінічних зразків проводили відразу або після зберігання в транспортному середовищі протягом доби при 40С. В якості первинного матеріалу використовували зішкріб із сечостатевих шляхів, носоглотки, кон'юнктиви та інші біологічні зразки, а саме харкотиння, суглобову рідину, сік передміхурової залози, навколоплідні води, зразки плаценти, зразки серцево-судинної системи.[4] Для успішного видалення збудників необхідно було враховувати тропність бактерії до певного типу клітини, залежно від типу, щоб запобігти токсичній дії деяких клінічних субстратів на моношар клітинної культури або на розвиваються курячі ембріони. шляхом розведення рідини живильним середовищем 199. У разі отримання матеріалу у вигляді післяопераційних проб необхідне приготування 5-10% суспензії шляхом механічного подрібнення, обертання в керамічному посуді та ресуспендування в необхідній кількості рідкого живильного середовища, що містить антибіотики. , з подальшим центрифугуванням протягом 10-15 хв при 1,5 тис. об/хв. і використання додатково розведеної супернатанту для інокуляції *in vitro* або *in ovo*. [4,5].

Виділення лабораторних культур збудника проводили за допомогою біотестів на лабораторних моделях *in vivo* та на штучних поживних середовищах *in vitro* з використанням ліній клітинних культур. Цим критерієм відповідав посів 224 клінічних зразків патологічного біоматеріалу, отриманого з урогенітального тракту та екстрагенітальних клітин 216 пацієнтів, у тому числі зішкрібків з кон'юнктиви та носоглотки, отриманих від немовлят та дітей раннього віку (до 1 міс.). народжені від матерів з обтяженим акушерсько-гінекологічним

анамнезом: синовіальна рідина, отримана від пацієнтів, які перебувають на стаціонарному лікуванні в ДУ «Інститут дерматології та венерології АМН України» з приводу хвороби Рейтера (середній вік – 38,1 року); зішкріб зі слизових оболонок сечостатевого тракту, отриманий від пацієнтів, які перебувають на стаціонарному лікуванні в ДУ «Інститут дерматології та венерології АМАН» на уrogenітальний хламідіоз (середній вік – років) та серцево-судинні зразки, отримані від пацієнтів, які перебувають на стаціонарному лікуванні в Відділення гострих судинних захворювань ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії АМН України» під час операції з приводу атеросклеротичного ураження аорти та магістральних судин нижніх кінцівок (середній вік – 68,5 років).[4,5,6]

2.2. Методи дослідження уrogenітального хламідіозу

Останніми роками швидко розвивається лабораторна діагностика хламідіозу. Ідеальний діагностичний тест чутливість > 90% та специфічність вище 99% повинен мати.

Класичним «золотим стандартом» вважається культуральний метод. Чутливість цього при використанні матеріалу з шийки матки і уретри варіює в межах 40-85%. Метод особливо інформативний при персистуючій хламідійній інфекції, оскільки дозволяє оцінити життєздатність збудника. В даний час використовують культуру клітин McCoу, що перевивається, і за допомогою моноклональних антихламідійних антитіл у прямій імунофлуоресценції ідентифікують *C.trachomatis*. До недоліків методу прийнято відносити те, що він вимагає наявності досвідченого персоналу, підходить лише для невеликого кількості зразків, отриманих інвазивним методом (з шийки матки та уретри) .

Морфологічні методи вимагають достатньої кількості епітеліальних клітин у досліджуваному матеріалі, щоб шляхом фарбування виявити структури збудника. Методи виявляють включення хламідій при фарбуванні за Романовським-Гімзом або розчином Люголя. Однак вважають, що чутливість методів невисока, а при фарбуванні розчином Люголя (коричневі гранулярні маси) включення повинні містити глікоген .

Застосування методу імунофлюоресценції дозволяє виявити свічення на ділянці мембрани епітеліальної клітини хворого, що вказує на адгезію хламідій та початок патологічного процесу. Для прямої імунофлюоресценції застосовують моноклональні антитіла проти основного білка зовнішньої мембрани (МOMP) *S. trachomatis* або ліпополісахариду (ЛПС). Ідентифікуючи структури збудника, метод не дозволяє судити про його життєздатність. Діагностичне значення має як облік ЕТ, так й РТ. При аналізі використовують мазки, відбитки та зіскрібки, що містять клінічний матеріал. Метод прямої і непрямой ІФ успішно використовується для диференціальної діагностики хламідіозу і для індикації специфічного антигену, зіскрібному матеріалі уретри і цервіксу. Імуноферментний аналіз призначений як для виявлення антигенів збудника, так і специфічних антитіл-85%. До переваг методу відносять можливість тестування великої кількості зразків, високу швидкість, автоматизацію, низьку вартість. До недоліків відносять те, що висока специфічність відзначається тільки при підтвердженні позитивних результатів, метод може застосовуватися тільки для матеріалу, отриманого інвазивним методом (з шийки матки, з уретри).

Чутливість методу РНК-ДНК гібридизації становить 70-85%.

До переваг відносять можливість тестування великої кількості зразків, високу швидкість, автоматизацію, можливість одночасної діагностики супутньої гонококової інфекції. До недоліків відносять те, що метод застосовується лише для зразків матеріалу, отриманих інвазивними методами (з шийки матки, з уретри).

Використання молекулярних зондів та техніки ампліфікації ДНК значно підвищило чутливість методів виявлення УГГ. Примітно, що у цих методах можна використовувати проби, отримані при неінвазивних процедурах, наприклад сечу обстеженого. Найчастіше застосовують ПЛР, ЛЦР, транскрипційну ампліфікацію.

В основі ПЛР лежить запуск реплікації ДНК на обмеженій ділянці під час використання наступних компонентів: спеціально підібраних праймерів, вільних нуклеотидів, ферменту полімерази. Повторювані цикли, що направляються олігонуклеотидами синтезу ДНК призводять до появи копій ДНК-мішені, які

можна виявити за допомогою електрофорезу в гелі, або методом гібридизації СО специфічним зондом з подальшим виявленням гібридів за допомогою ІФА. Реакцію здійснюють у різних температурних режимах: нагрівання (денатурація ДНК) та охолодження або відпал (ренатурація з відновленням двониткової ДНК).

2.2.1. Методи культуральної діагностики

Виділення збудника в культурі клітин:

Для проведення культуральних досліджень у стерильні плоскодонні пробірки діаметром 14 мм з покривними скельцями на живильному середовищі додають 1 мл суспензії клітин ліній 1929, Ner-2 або MeSou (1x10 кл/мл), які інкубують. 24-48 годин в термостаті при 35 -37 °С до утворення моношару. У флакони з транспортним середовищем, що містить клінічний матеріал, при інтенсивному струшуванні додають мл свіжого живильного середовища з антибіотиками і залишають на 1 год. Потім із пробірок з моношаром зливають живильне середовище і вносять в них досліджуваний матеріал по 500 мкл на моношар клітин з подальшим центрифугуванням протягом години при 3000 об/хв у центрифугі з горизонтального ротора, після чого проводять інкубацію в термостаті при 35-37 °С протягом 2 годин. Після видалення посіву вносять відповідну кількість живильного середовища 199 з 5% ETS з додатковим внесенням 1 мкг/мл циклогексимиду та подальшою інкубацією в термостаті при 35-37 °С протягом 48-104 годин залежно від вид збудника.

Виділення збудника в курячих ембріонах 6-7-денного віку, що розвиваються: Екстракцію мікроорганізму в курячих ембріонах проводять шляхом зараження жовткових мішків на 6-7-му добу інкубації біологічним матеріалом у кількості 0,5 мл. Інфіковані яйця інкубують при +35 °С і високій відносній вологості до 13 днів із щоденною перевіркою життєздатності ембріонів в овоскопі. У разі загибелі ембріонів після охолодження проводять розтин, видаляють жовткові оболонки, які використовують для подальшої пасивації та дослідження мазків-відбитків з метою виявлення морфологічних структур хламідій.

2.2.2. Імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA)

Методом ІФА визначали наявність антигену збудника виду *C.trachomatis* у пробах, отриманих від лабораторних тварин, при проведенні експерименту з визначення патогенних властивостей досліджуваних штамів.[2]

Принцип методу. Був використаний твердофазний ІФА за допомогою мікропланшет, покритих антитілами до досліджуваного антигену (структури) цитокіну, наприклад TGFB. У лунки мікропланшет послідовно додають стандарти, контролі та зразки, що визначаються, а потім другі, біотинізовані антитіла. При першій інкубації антиген зв'язується з іммобілізованими в лунках антитілами одним із сайтів зв'язування, а з біотин-антитілами другим сайтом зв'язування. Після видалення надлишку других антитіл до лунок додають стрептавідин-пероксидазу, яка зв'язується з біотин-антитілами з формуванням сендвіч-комплексу з реагентів. Після другої інкубації та промивання видаляють незв'язаний фермент. Далі додають субстрат ферменту, що містить хромоген. Фермент та субстратний розчин реагують з утворенням кольорового комплексу. Інтенсивність фарбування розчину прямо пропорційна концентрації цитокіну, що є присутнім у дослідному зразку сироватки.

Реактиви: Тест-система «Векто Хлами Антиген Стріп» виробництва ЗАТ «Вектор-Бест».

Спеціальне обладнання: ІФА-аналізатор "Multiscan EX" (Фінляндія), сухоповітряний термостат TS-80 M2.

Хід дослідження: в лунки стрипів вносять по 100 мкл досліджуваних і контрольних зразків, після відповідного періоду інкубації згідно з інструкцією виробника в кожен лунку поступово додають розчини індикатора та кон'югату з 5-кратним промиванням. смужок після кожного етапу та зазначеного періоду інкубації, завершуючи аналіз додаванням тетраметилбензидину та стоп-реагенту.

Оцінка результатів, після реєстрації результатів на аналізаторі ІФА розраховують середнє значення негативного контролю (Ощер.К) з подальшим обчисленням критичної оптичної густини, додавши до Ощер.К 0,3. Позитивними вважаються зразки, оптична щільність яких перевищує критичну.

2.2.3. Молекулярно-генетичний метод ідентифікації

Цей метод є найбільш надійним методом дослідження спадкових захворювань. Перевага ДНК-діагностики перед іншими методами молекулярної генетики людини полягає в тому, що цей метод дозволяє точно виявити і дослідити першопричину захворювання (ген, його локалізацію, вид пошкодження). Цей метод дозволяє виявити навіть мінімальні порушення первинної структури ДНК (включаючи одонуклеотидні заміни), які неможливо дослідити іншими методами. ДНК-діагностика є малоінвазивною процедурою (достатньо 1-2 мл крові, буккального епітелію або декількох клітин плодового матеріалу, взятого в першому триместрі вагітності). Крім того, такий аналіз не потрібно повторювати при виявленні мутації, достатньо одного дослідження за життя пацієнта і навіть після його смерті.

Цей метод вимагає обов'язкового першого етапу - отримання зразка ДНК. Залежно від цілей дослідження проводиться наступний аналіз.

Основними методами ДНК-діагностики в даній роботі були: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), фрагментний аналіз продуктів ПЛР за допомогою різних видів ДНК-гель-електрофорезу, визначення нуклеотидної послідовності ДНК за допомогою секвенування, ПЛР в реальному часі.

2.2.4. Метод електронної мікроскопії

Для електронно-мікроскопічного дослідження суспензію інфікованих клітин промивали центрифугуванням у фосфатно-сольовому буфері (PSB) і фіксували протягом 2 годин при +4 °C у 2% розчині глутарового альдегіду, приготовленому в PBS (pH 7,3-7,4). Потім матеріал промивали у фосфатному буфері та постфіксували в 1% розчині чотириокису осмію на 1 годину. Після дегідратації спиртами зростаючої концентрації (30% > 96% і двічі в абсолютному спирті) клітини просочували епон-аральдитовою сумішшю. Зразки, поміщені в поліетиленові капсули, заповнювали смолою і полімеризували при 60 °C протягом 48 годин. Для вибору необхідної досліджуваної зони робили напівтонкі зрізи товщиною 1 мкм, які фарбували метиленовим синім і переглядали на мікроскопі МБЙ-15 з цифровою відеокамерою. Для електронної мікроскопії ультратонкі зрізи, отримані на ультрамікротомі UMTT1-7,

контрастували насиченим водним розчином уранілацетату та розчином цитрату свинцю Рейнольдса. Ультраструктуру клітин вивчали за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125Д прискорювальною напругою 75 кОм, оснащений системою захоплення та аналізу зображення ДАІ 01 А (АТ «СЕЛМІ», м. Суми) на основі ПЗЗ-камери DX-2 та пакету програм фірми «KARPA». ", Німеччина.

2.2.5. Статистичний метод оцінки даних

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою стандартного пакету прикладних програм для медико-біологічних досліджень на персональному комп'ютері з використанням програм Microsoft Office для Windowsxp.

Висновки до розділу 2

1. Найбільш ефективним об'єктом для вилучення чистих культур хламідій виявилися проби уражених клітин уретриу вигляді зішкрябного матеріалу та синовіальна рідина. Переважну більшість штамів (70%), що відносяться до колекції тест-культур хламідій, ізолювано з цього біоматеріалу.
2. Для повного мікробіологічного дослідження хламідій є необхідним комплексне використання сучасних методичних підходів: додаткове внесення у поживне середовище незамінних амінокислот та цинку, що стимулює метаболізм збудника і підвищує їх життєздатність при перенесенні його у курячі ембріони. Це підсилює та оптимізує можливість отримання життєздатних лабораторних штамів хламідій у результаті швидкої адаптації.
3. Для більш точного встановлення діагнозу необхідно ввести так званий "подвійний золотий стандарт" у лабораторній діагностиці урогенітального хламідіозу, тобто використовувати два незалежні методи: ПЛР та імуноферментний аналіз; посів та імуноферментний аналіз

РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Мікробіологічні особливості хламідій

Хламідії — дрібні грамнегативні бактерії діаметром від 0,2 до 0,8 мкм. При відносно невеликому розмірі хромосоми (1000 кВ) гени можуть кодувати до 600 білків. Джерелом росту є як поживні речовини, так і АТФ клітин хазяїна, тобто це енергетичні паразити, передача інфекції можлива статевим шляхом, а також внутрішньоутробно вертикальним шляхом і від матері до дитини під час пологів. Хламідії мають унікальний двофазний цикл розвитку.

Існують дві функціонально і морфологічно різні форми клітин: інфекційні, метаболічно неактивні елементарні тільця, пристосовані до позаклітинного існування, і реплікулярні тільця, які знаходяться всередині клітин і активно діляться. Тільки після перетворення ретикулярного тільця в елементарне збудник здатний вражати нові клітини. Відповідно до сучасних уявлень, цикл розвитку збудника включає наступні стадії:

- прилипання елементарних тілець хламідій, які прикріплюються до клітин циліндричного епітелію; для впровадження в епітеліальні клітини слизової оболонки бактерії синтезують ліганд для клітинних рецепторів (гепариносультфатоподібні молекули), який опосередковує інфекційність і є фактором патогенності;
- інвазія, процес пригнічення злиття фагосом і лізосом;
- утворення цитоплазматичних включень, де відбувається первинна диференціація елементарних тілець в ретикулярні, в результаті чого через 24 години утворюються ретикулярні тільця;
- ріст реплікативних форм бактерій до 48 годин.
- вторинна диференціація РТ в ЕТ з подальшим лізисом клітин і вивільненням ЕТ в мікрооточення до 72 годин (частина хламідій залишається всередині клітин).

Таким чином, новоутворені ЕТ здатні інфікувати інші клітини-мішені приблизно через 72 години. Фактори патогенності сприяють циклу розвитку хламідій. Вони включають:

1. білок теплового шоку (hsp 60);

2. INC-білки, що входять до складу мембрани;
3. Основний білок зовнішньої мембрани (MOMP).

Виходячи з біологічних властивостей збудника та циклу його розвитку, можна зробити висновок, що це внутрішньоклітинні збудники, здатні вражати та пошкоджувати репродуктивні органи. У зв'язку з цим виникає питання про те, який можливий результат у системі взаємодії господар-паразит.

Пропонуються 3 основні способи взаємодії:

- Власний цикл розвитку;
- руйнування у фаголізосомах;
- L-подібне перетворення.

Розглянуто припущення про те, що в основі одного з механізмів розвитку персистуючої форми хламідійної інфекції лежить L-подібна трансформація збудника.

3.1.1. Морфофункціональні відмінності

ЕТ і РТ утворюють всередині клітин циліндричного епітелію цитоплазматичні включення різної форми, характерні для колоній хламідій, які на ранніх стадіях інфекційного процесу розташовуються переважно поблизу клітинного ядра і досягають розміру 10 мкм, тобто 10 мкм. добре видно під мікроскопом. У зрілому включенні всі ретикулярні тільця поступово заміщуються елементарними, клітина-хазяїн розривається, що супроводжується пошкодженням клітинної мембрани і виділенням ЕТ. Ці дані детально викладені в монографії Ільїна І.І.

Пізніше Ільїн І.І. та Делекторський В.В. представили результати електронно-мікроскопічного дослідження структури *C.trachomatis* та вивчення характеру зв'язку збудника з культурою клітин MsSou (McCoy) та клітинами уражень хворих на уrogenітальний хламідіоз, що дозволило виявити низку нових фактів, які розширюють уявлення про патогенез УГГ. У цитоплазмі клітин MscSou, оброблених циклогексимидом (2 мкг/мл), утворюються мембранообмежені зони з більшою чи меншою кількістю початкових форм. Вакуоль витісняє ядро ураженої клітини і може займати більшу частину її цитоплазми.

На ультратонких зрізах РТ виявлені коки з центрально розташованим нуклеотидом і цитоплазмою, що містить велику кількість рибосом і обмежена по периферії двоконтурною цитоплазматичною мембраною. У 8 з них поглинається товщина цитоплазматичної мембрани. Клітинна стінка гладка, з мембранним компонентом, характерним для грамнегативних бактерій. Зовнішній і внутрішній електронно-щільні шари клітинної стінки розділені шаром помірної електронної щільності. Товщина кожного з цих шарів становить близько 3 нм. Розмір ретикулярних тілець (РТ) *S. trachomatis* при культивуванні на клітинах MeSou коливається від 05 до 07 мкм. Перед поділом клітини набувають злегка яйцевидної форми, в якій чітко виділяються дві зони нуклеотидів.

ЕТ менші за розміром (близько 0,2 мкм у діаметрі). Їхня цитоплазма більш компактна і відтісна на периферію електронно-щільним нуклеоїдом.

ЕТ менші за розміром (близько 0,2 мкм у діаметрі). Їхня цитоплазма більш компактна і відтісна на периферію електронно-щільним нуклеоїдом. Найчастіше ці форми можна спостерігати при виході збудника з пошкоджених клітин McSou.

Були отримані докази ураження при UGH як циліндричного епітелію, так і багат шарового плоского.

Фолікули, які виробляє *S. trachomatis*, є справжніми лімфоїдними фолікулами із зародковими центрами. Патогістологічна картина гострого ендометриту характеризується вираженим поширенням запального інфільтрату плазматичними клітинами. У всіх біоптатах в стромі ендометрія виявляються лімфоцити. У більшості хворих виявляються лімфоїдні фолікули з трансформованими лімфоцитами. Розміри лімфоїдних фолікулів різноманітні. Клітини, що утворюють ці фолікули, в основному лімфоїдного типу (трансформовані лімфоцити з великою кількістю піроніну в цитоплазмі). Зірчасті фагоцити зустрічаються рідко. По периферії лімфоїдних фолікулів зазвичай виявляється щільна інфільтрація плазматичними клітинами. Гістологічна картина, що вказує на ендометрит, часто спостерігається при дослідженні зіскрібків зі слизових оболонок під час абортів і пологів. Гістопатологічні дослідження пацієнтів з безпліддям показали, що наявність

плазматичних клітин всередині ендометрія вважається гістопатологічним визначенням ендометриту, тоді як наявність поліморфноядерних лейкоцитів і лімфоцитів може спостерігатися навіть під час нормального менструального циклу. *C. trachomatis*, за винятком штамів, що викликають венеричну лімфогранульому, є патогенними збудниками епітелію слизових оболонок. Особливо чутливий до них циліндричний епітелій.

3.1.2. Особливості метаболічної активності.

Система взаємодії хазяїн-паразит має досить складний молекулярно-мембранний механізм, особливо у мікроорганізмів, для яких умова обов'язкового внутрішньоклітинного існування є визначальною для реалізації продуктивного циклу розвитку та виживання у внутрішньому середовищі клітини. Діяльність хламідій тісно пов'язана з активацією метаболізму бактерії та стимуляцією метаболічних процесів у клітинах господаря для компенсації енергетичного навантаження, спричиненого інфекцією. Біосинтез ключових метаболітів-попередників, необхідних бактерії для основних метаболічних шляхів, здійснюється в результаті каскаду хімічних реакцій, які зазвичай називають центральним метаболізмом. Відомо, що стимуляція метаболічних процесів відбувається за рахунок посиленого використання глюкози як основного енергетичного субстрату в гліколітичному та пентозофосфатному шляхах, інтенсивність окремих етапів яких у різних представників ряду *Chlamydiales* варіабельна.

Хламідії здатні стимулювати транспорт глюкози, індукуючи експресію всюдисущих транспортерів глюкози GLUT-1 на поверхні клітин, що призводить до інтенсифікації утворення високоенергетичних метаболітів, що збігається зі збільшенням споживання глюкози. У зв'язку з викладеним значний інтерес викликало визначення впливу різних представників родини на стан метаболічних процесів при інфікуванні клітинних культур досліджуваними штамми.

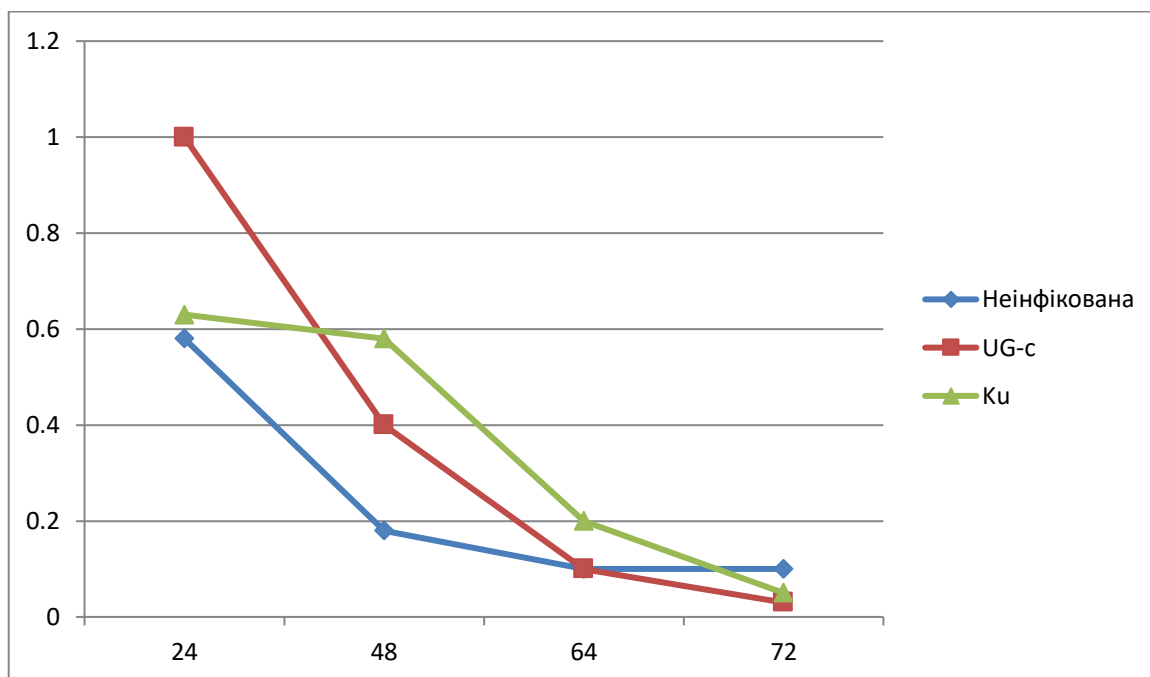
З метою оцінки інтенсивності метаболічних процесів, що відбуваються в трансплантованих лініях культури клітин при зараженні різними видами мікроорганізмів, проводили дослідження з встановлення порівняльної динаміки

утилізації глюкози в інкубаційному середовищі та визначення показників утвореної рибози в суспензії інтактних та інфікованих клітин з урахуванням стадії розвитку збудника. Показники вимірювали при культивуванні досліджуваних штамів *C.trachomatis* та виду *C.pneumoniae* на культурах клітин різного походження за тропністю збудника.

При вивченні порівняльної динаміки використання глюкози визначали різну інтенсивність катаболічного процесу глюкози між інфікованими та інтактними культурами клітин за обраних відповідних періодів інкубації. Аналізуючи отримані результати, встановлено, що кількість глюкози, яка споживається неінфікованими лінійними культурами різного походження, практично не змінюється протягом досліджуваних періодів часу. При порівнянні показників споживання глюкози встановлено, що найбільшим значенням характеризується перший 24-годинний інтервал розвитку культури, коли швидкість поглинання була найбільшою, потім вона значно знижувалася і залишалася приблизно однаковою до кінця вирощування. Подібна динаміка утилізації глюкози клітинами неінфікованої культури відображає особливості вуглеводного обміну в клітині на різних стадіях розвитку.

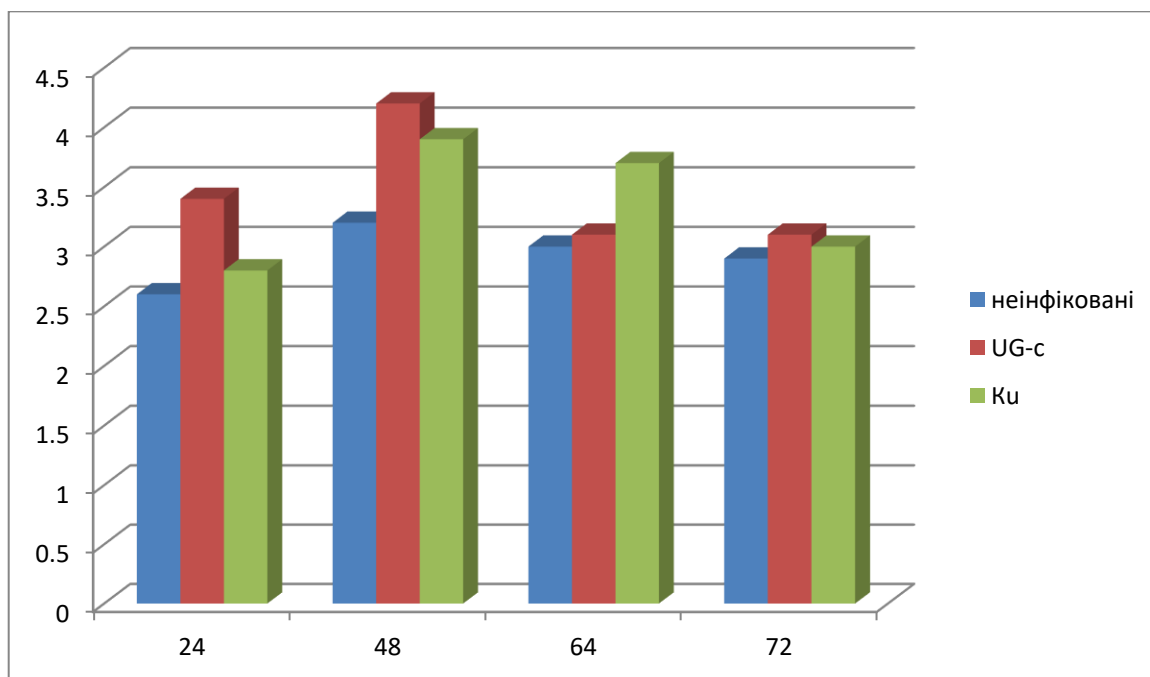
При вивченні метаболічної активності урогенітальних штамів встановлено, що рівень утилізації глюкози в інкубаційному середовищі інфікованих культур клітин був вищим, ніж у неінфікованих, вже на початкових етапах розвитку збудника. При візуалізації моношару інфікованих клітин оцінка ступеня пошкодження показала, що середній відсоток інфікованих клітин досягав 80% - для штамів UG-с і до 50% для штамів Ku. На графічних зображеннях, представлених на рисунку 3.1, помітна різниця у кількісному вираженні показників утилізованої глюкози між обома урогенітальними штамми.

Рис.3.1



Наступним етапом дослідження метаболічної активності уrogenітальних ізолятів було вимірювання показників утвореної рибози в суспензії клітин інтактної та інфікованої культури клітин L-929 при одночасному культивуванні штамів.рис.3.2

Рис.3.2

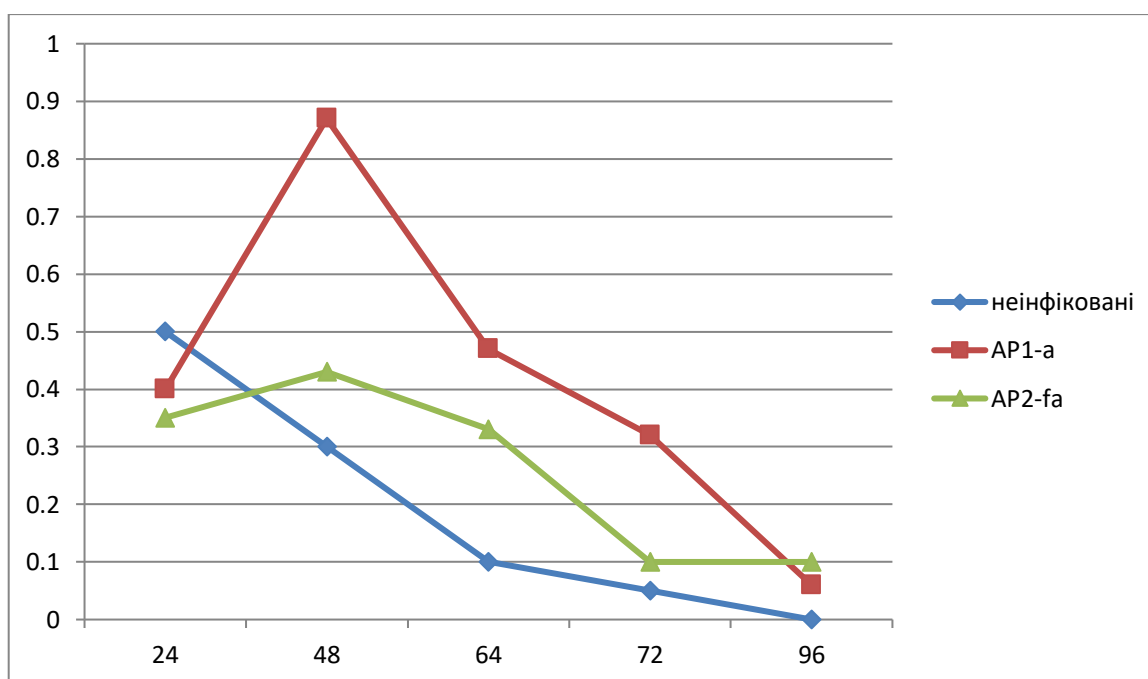


Аналіз отриманих результатів показав, що високоінтенсивне споживання глюкози викликає більш високі рівні утворення рибози як кількісно, так і випадково в інтервалах часу. Як видно на діаграмах, показники утвореної рибози

є вищими після першої доби інкубації для штаму UG-с і значно нижчими для штаму Ku.

З метою встановлення метаболічної активності судинних ізолятів виду *S. pneumoniae* також було проведено аналогічне дослідження рівнів споживання глюкози та утворення рибози в циклі їх розвитку.рис.3.3 У попередніх дослідженнях було встановлено, що тривалість онтогенезу цих штамів займає більший часовий інтервал порівняно зі штамми *S. trachomatis*. Слід зазначити, що показники катаболізму глюкози також відрізнялися від досліджуваних раніше штамів, що було встановлено під час дослідження.

Рис.3.3



Щоб детально з'ясувати відмінності між штамми щодо їх метаболічної активності, було перераховано кількість глюкози, яку поглинає одна клітина. Отримані результати наведені на рисунку.3.4

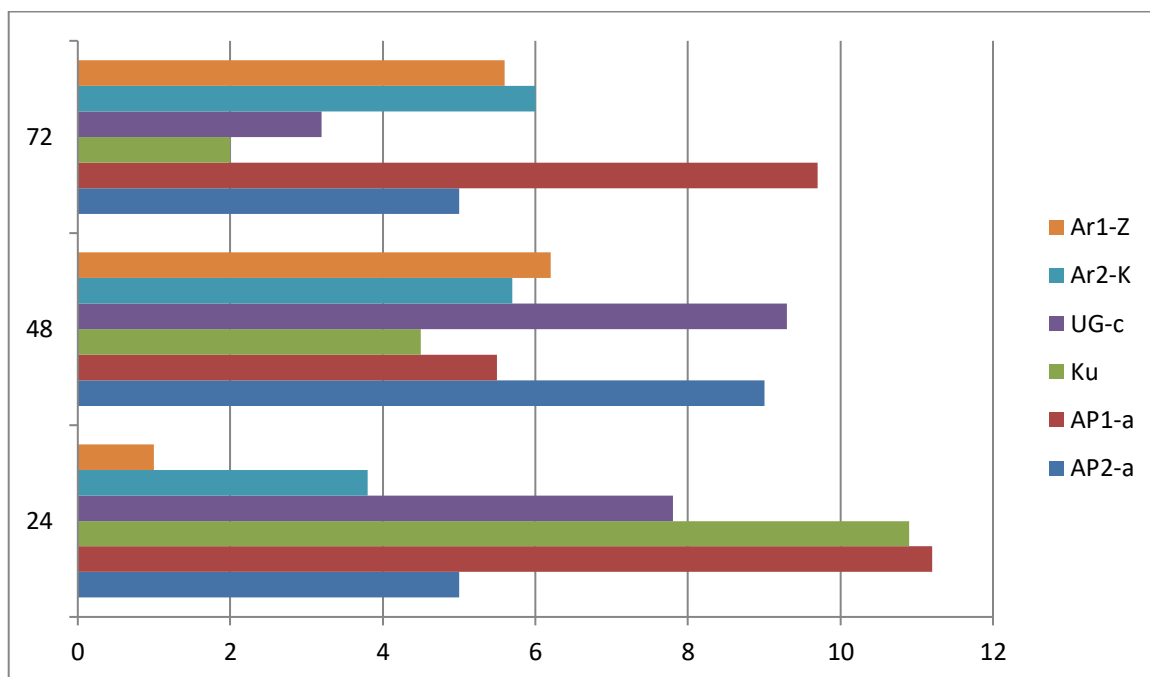


Рис.3.4

Таким чином, у результаті проведених досліджень встановлено, що впровадження збудників родини *Chlamydiaceae* у клітини різних ліній викликає інтенсифікацію енергетичного обміну за рахунок збільшення швидкості споживання глюкози, як основного субстрату для продукції високих енергетичних метаболітів в гліколітичному шляху та ініціація утворення конструктивних попередників біосинтезу нуклеотидів рибозофосфату в пентозофосфатному шляху. Встановлені дані демонструють відмінності показників як при порівнянні інфікованих та інтактних клітин різних ліній, так і при порівнянні отриманих результатів щодо особливостей реалізації продуктивного циклу розвитку не тільки на рівні сортів родини *Chlamydiaceae*, а й на рівні окремих штамів збудника. Аналіз результатів дослідження прямо вказує на різницю в ефективності проходження зазначених етапів розвитку внаслідок різної інтенсивності метаболічних процесів, підтверджує наявність встановлених ростових характеристик досліджуваних штамів та свідчить про неоднаковість тривалість онтогенезу, властива цим варіантам збудників.

3.2. Сучасні методи лабораторної діагностики уrogenітальної хламідійної інфекції.

Встановлено, що уrogenітальна хламідійна інфекція характеризується прихованим, хронічним перебігом, невідповідністю клінічних проявів

морфологічним змінам в уражених тканинах, а також вираженими дисфункціональними змінами системи протиінфекційної резистентності організму, внаслідок чого відбувається транслокація хламідій. з боку сечостатевих шляхів утворює вторинні вогнища інфекції. На основі даних літератури встановлено необхідність подальшого вдосконалення методів лабораторної діагностики уrogenітальної хламідійної інфекції на основі розширення переліку досліджуваних клінічних проб з метою створення єдиного алгоритму обстеження хворого з підозрою на обґрунтовано генералізовану форму уrogenітальної хламідійної інфекції.

За даними численних досліджень, уrogenітальним хламідіозом уражено 40-80% жінок та 20-60% чоловіків з інфекційно-запальними захворюваннями сечостатевих органів [37]. У більшості випадків уrogenітальний хламідіоз протікає без вираженої клінічної симптоматики, що суттєво ускладнює діагностику, сприяє поширенню хвороби та ранньому розвитку ускладнень [28]. У 24% чоловіків та 70-90% жінок захворювання протікає безсимптомно, при цьому хламідійна інфекція виявляється у 25-50% пацієнток із запальними захворюваннями органів малого тазу (ЗЗОМТ) та у 34% чоловіків з епідидимітом.

Важливим діагностичним критерієм є виявлення хламідій у крові [13, 14]. Це пов'язано з високою залежністю результатів діагностики від вибору відповідного методу лабораторного дослідження; правильної підготовки пацієнта до дослідження; правильного взяття клініцистом матеріалу для дослідження з осередків хламідійного ураження; правильної попередньої підготовки забраного матеріалу та своєчасного проведення дослідження; правильного зберігання та доставки матеріалу на дослідження; матеріально-технічного забезпечення лабораторного дослідження; рівня кваліфікації медичного персоналу[10].

При уrogenітальної хламідійної інфекції застосовують дві основні стратегії: обстеження з метою діагностики, спрямоване на визначення симптомів інфекції, викликаной *C. trachomatis* і обстеження осіб, що входять до групи ризику. Для мікробіологічної діагностики уrogenітального хламідіозу застосовують

культуральний, мікроскопічний, серологічний та молекулярно-генетичні методи.

«Золотим стандартом» у лабораторній діагностиці уrogenітального хламідіозу вважається культуральний метод. Клінічним матеріалом, отриманим від хворого, заражають моношар культури клітин McCoy, PL, HeLa-920, Herp-2, BGМК, культуру мишачих фібробластів L-929, оброблену антиметаболітами, цитостатиками [3, 6, 14]. Через 48-72 години клітини фіксують, обробляють барвниками та мікроскопують. Результат оцінюють за наявності специфічних внутрішньоклітинних хламідійних включень методами прямої або непрямой імунофлюоресценції (з використанням моноклональних або поліклональних флюоресціюючих протихламідійних АТ). При отриманні негативних результатів рекомендується провести новий посів матеріалу. Виявлення хоча б одного цитоплазматичного включення, що має специфічне фарбування, форму і структуру, достатньо для констатації наявності хламідій у досліджуваному зразку.

Мікроскопічний метод діагностики уrogenітального хламідіозу найбільш простий та доступний. Він дає загальне уявлення про цитологічну картину, морфологію клітин з вогнища ураження, наявність мікробного обсіменіння, грибів і найпростіших. Специфічні морфологічні ознаки дозволяють визначити наявність хламідій у препараті. Найбільш поширеними методами є забарвлення препаратів по Романівському-Гімзі, Маю-Грюнвальду-Гімзі, Макіавелло, Папаніколау, розчином Люголя [6, 10, 28]. При фарбуванні по Гімзі включення хламідій виявляються як округлі або овоїдні структури, що складаються з червоно-фіолетових ЕТ та синьо-фіолетових РТ. У препаратах можна оцінити морфофункціональний стан лімфоцитів та нейтрофілів. Наявність у препараті тілець Гальбершtedтера Провачека підтверджує діагноз хламідіозу, проте їхня відсутність не виключає наявності інфекції. На частоту виявлення включень істотно впливає характер перебігу інфекційного процесу, якість досліджуваних зіскрібних препаратів. Чутливість методу становить 10-15%, специфічність 10-30% [5]. Метод не застосовується для скринінгових досліджень. Діагностична значущість мікроскопічного методу досить низька: у

чоловіків виявити хламідії з його допомогою вдається лише у 10-15%, а у жінок – до 30-40% випадків (у зіскрібках з цервікального каналу).

Молекулярно-генетичні методи діагностики останніми роками посіли місце «золотого стандарту», яке раніше належало культуральному методу [5, 12]. Розроблено методи гібридизаційного аналізу на основі мічених ДНК/РНК-зондів. В якості гібридизаційних зондів використовували фрагменти ДНК, отримані шляхом клонування в плазмідних або фагових векторах специфічних ділянок досліджуваних об'єктів, а також штучно синтезовані одноланцюгові олігонуклеотиди (переважно ДНК), послідовність яких комплементарна певному видоспеку-цифом. Чутливість методу становить 70-85%; його перевагою є можливість тестування великої кількості зразків, швидкість, автоматизація може застосовуватися тільки для зразків матеріалу, отриманих інвазивними методами (з шийки матки, уретри) [4].

Методи ДНК-діагностики ґрунтуються на комплементарній взаємодії нуклеїнових кислот, що дозволяє з високою точністю ідентифікувати послідовність нуклеотидів у генах шуканого мікроба. Серед них найбільшого поширення набула ПЛР. В основі ПЛР лежить багаторазова ампліфікація певного фрагмента ДНК, який є маркерним для даного патогену. За допомогою ПЛР можна виявити плазмідну ДНК *S. trachomatis*, фрагменти хромосомної ДНК, що кодують МОМР, рибосомальну РНК та ін. методом гібридизації зі специфічним зондом з подальшим виявленням гібридів методом ІФА. До переваг цього методу відносяться висока чутливість 70-95% та специфічність 97-99%, а також можливість тестування великої кількості зразків [15, 20, 29, 35]. За допомогою ПЛР можливе одержання практично необмежених кількостей специфічної ДНК.

Для верифікації уrogenітальної хламідійної інфекції запропоновано новий спосіб діагностики - реакція специфічного лейкоцитолізу (РСЛ), заснована на визначенні у крові високого показника руйнування лейкоцитів у хворих на уrogenітальний хламідіоз. РЛС має високу чутливість (100%) і може бути використана як підтверджує тест у комплексній діагностиці уrogenітальних захворювань [9].

Важливою ланкою в комплексі клініко-лабораторних заходів при урогенітальному хламідіозі є оцінка ефективності терапії застосування лабораторних тестів для встановлення критерію вилікуваності. Головним надійним методом встановлення ефективності проведеного лікування є культуральний метод (через 14 днів після закінчення антибактеріальної терапії), використання ПЛР не рекомендується з метою контролю лікування. Адекватними і доступними способами контролю лікування хламідійної інфекції є ППФ і ПЛР, виконані відповідно не раніше ніж через 2 тижні і через 30-40 днів після закінчення терапії. Поєднання різних діагностичних методик суттєво підвищує ефективність та надійність контролю терапії урогенітального хламідіозу [2, 12].

Шляхом багаторічних науково-прикладних досліджень створено основу лабораторних методів діагностики урогенітального хламідіозу, що дозволяє в більшості випадків достовірно встановлювати наявність інфекції, динаміку запального процесу, ефективність терапії, що проводиться, і критерію вилікуваності [3]. Вибір методу дослідження та спосіб оцінки результатів при діагностиці урогенітального хламідіозу мають важливе значення. Водночас жоден із існуючих методів діагностики урогенітальної хламідійної інфекції не є оптимальним. "Золотим стандартом" є грамотний комплексний підхід до діагностики хламідіозу - підтвердження наявності патогену двома або трьома різними методами [3, 12, 23]. Майбутнє в діагностиці хламідіозу належить ПЛР, особливо ПЛР у реальному часі та NASBA у реальному часі, які можуть бути використані як арбітражне підтверджувальне тестування та для контролю вилікуваності [17].

В даний час відсутня не тільки єдиний алгоритм обстеження хворого з підозрою на урогенітальну хламідійну інфекцію, особливо на поширену форму урогенітальної хламідійної інфекції із затяжним, рецидивуючим перебігом захворювання, але й єдина думка про трактування отриманих результатів. Для достовірної верифікації збудника при генералізованій хламідійній інфекції необхідно розширювати перелік досліджуваних клінічних зразків від хворих не тільки з урогенітального тракту, але також з інших органів та систем. Важливим

лабораторно-діагностичним критерієм є виявлення хламідій у крові, що дозволяє об'єктивно діагностувати генералізовану форму урогенітальної хламідійної інфекції [8, 13, 14]. Розробка сучасних, недорогих, високочутливих та специфічних методів лабораторної діагностики урогенітального хламідіозу залишається актуальною і становить величезне значення для медичної науки та практичної охорони здоров'я.

3.3. Характеристика патогенних властивостей лабораторних штамів хламідій.

З метою визначення патогенності штамів *C. trachomatis* проводили зараження дрібних лабораторних тварин.

Дослідження проводилося на 112 чистокровних білих мишах. З для накопичення біомаси збудника штами *C. trachomatis* культивували в системі культур клітин L-929 по 3 пасажу за стандартною методикою. Для вивчення патогенності штамів *C. trachomatis*, виділених від хворих на урогенітальні та екстрагенітальні прояви інфекції, тварин заражали інтраназально. Кількість мишей у кожній дослідній групі була однаковою (n=12). За станом здоров'я та самопочуттям спостерігали протягом 5 тижнів.

Найбільш інтенсивно клінічні ознаки розвитку захворювання та терміни смерті виражені в дослідній групі, якій інокульували суглобовий ізолят Ag2-K. Починаючи з 4-ї доби після зараження спостерігалось погіршення стану тварин: миші мляві, нерухомі, ізольовані, шерсть виглядала розпатланой, тьмянний. За наступні 5 днів загинуло 9 мишей, що склало 75% від загальної кількості інфікованих. Порівняно з вищеописаною групою стан здоров'я тварин, яким була введена культуральна суспензія другого суглобового штаму Ag1-Z, був цілком задовільним. Миші мали зовнішній вигляд, схожий на інтактних мишей, мали нормальний апетит, активність і рухливість, хутро було гладким і не скуйовдженим. Лише у 2 тварин на 8-й день після зараження відзначені незначні ознаки захворювання: млявість, замкнутість; з розвитком захворювання симптоми погіршення стану посилювалися і на 12 добу настала їх смерть. Інші тварини цієї експериментальної групи залишилися живі. Перебіг хвороби у мишей третьої групи, яких інфікували суспензією урогенітального штаму Kі, характеризувався повільним розвитком і меншою вираженістю патологічної

симптоматики порівняно з тваринами першої групи, але був сильнішим. ніж у другому. Ознаки захворювання у мишей почали проявлятися на 6-ту добу після зараження, відмічали припухлість, нерухомість, ізоляцію. Стан здоров'я тварин класифікують як середньої тяжкості. При зараженні 4 дослідних груп мишей урогеніт ізолят UGC має дещо сильніший патогенний потенціал штаму. Перші ознаки захворювання помічаються на 3-4-й день (припухлість, ознаки порушення дихання). На 7-8-й день загинуло 50% тварин. При розтині як мертвих, так і живих мишей відмічали вогнищеві та дрібноточкові крововиливи легеневих тканин. Різниця спостерігалася в ступені ураження органів. Для оцінки патологічних ознак ураження органів загинлих мишей проводили гістологічне дослідження тканин.

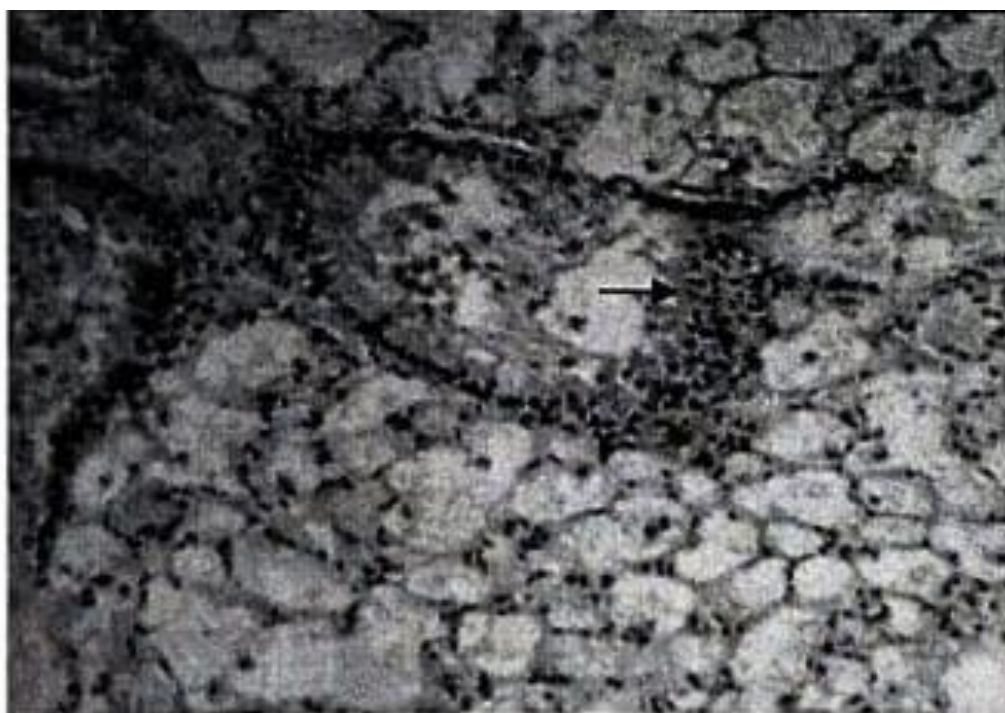


Рис.3.5.

Ослизнення, злушення гіперплазія епітеліальних клітин Гематоксилін та созиин х 250. Рис.3.5.

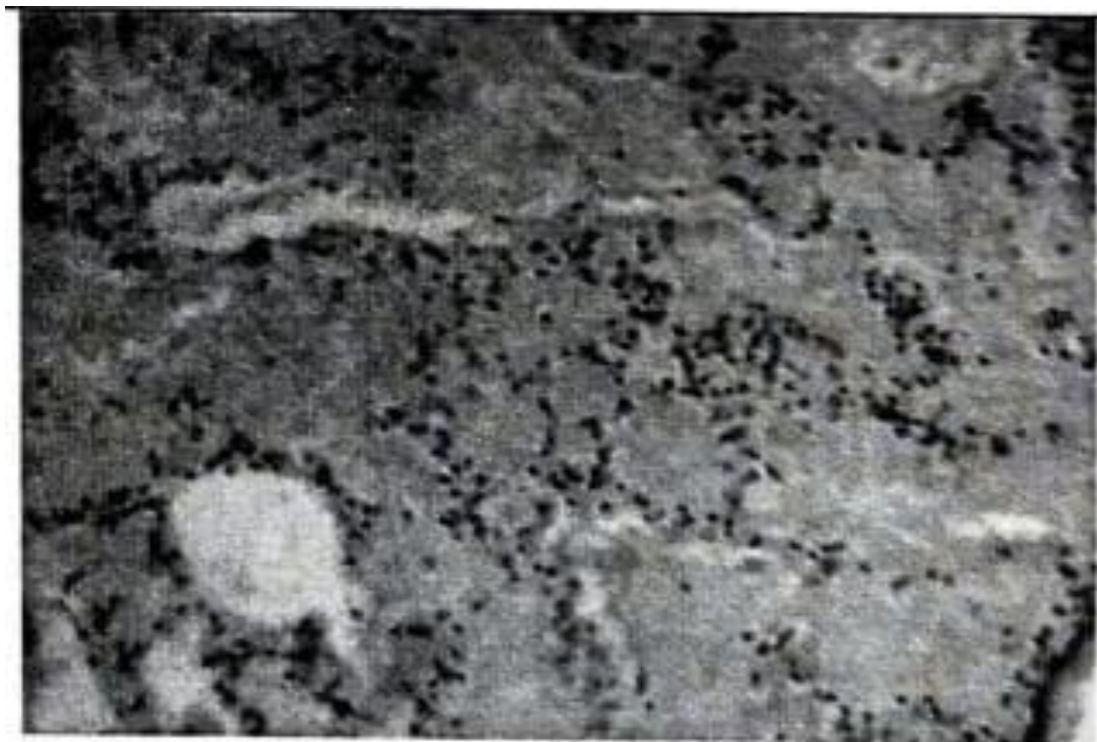


Рис.3.6

У просвіті альвеол фібрин або еритроцити, епітелій злущений. Гематоксилін та созин x 250. Рис.3.6

Встановлено, що морфологічні зміни в легенях були найбільш інтенсивно виражені в групі тварин, інфікованих штамом Ar2-K. Морфологічна картина характеризувалася певною мінливістю. У легенях першої мертвої миші просвіт був заповнений фібрином, слизом, кров'ю і цілими шарами злущеного епітелію. Перибронхіально визначалися щільні клітинні інфільтрати. У більшості тварин спостерігали інтерстиціальну пневмонію та червоне печіння в легеневи́х тканинах: у розширених перегородках велика кількість клітин запального інфільтрату, заповнення просвіту багатьох альвеол еритроцитами, перибронхіальне розташування клітинного інфільтрату, представленого переважно лімфоцити і нейтрофіли. У легеневи́х тканинах тварин, які загинули останніми, вираженість процесів десквамації відповідала вираженості мікроциркуляторних та запальних розладів. Стінки бронхів практично розплавлені, є вогнища, в яких не визначаються ні альвеолярні просвіти, ні міжальвеолярні перегородки. При дослідженні гістологічних зрізів серця встановлено, що гістоструктура тканин у більшості зразків в основному збережена, структура волокон не порушена, іноді міжфіброзні простори

інфільтровані лімфоцитами більше норми, розміри ядра кардіоміоцитів різноманітні, є дуже близько розташовані ядра. Процеси десквамації в легеневих тканинах мишей, інфікованих штамом Arl-Z, виражені значно слабше, ніж у попередній групі. Злущувалися лише апікальні частини епітеліоцитів, спостерігалася гіперплазія слизових клітин, серед слизу визначався злущений епітелій, фібрин, клітинний інфільтрат. В окремих дрібних бронхах визначена десквамація всього шару епітелію. У тканинах серця мишей цієї групи відхилень від норми не виявлено, гістоструктура серцевих волокон і строми не порушена. У легенях мишей, заражених штамом Kі, виявлено поліморфний малюнок. В одному випадку відмічено слиз і десквамацію епітелію бронхів, іноді вогнищеву проліферацію епітеліальних клітин. У просвіті, крім слизу та епітелію, виявлено значну кількість лейкоцитів. Ще у трьох тварин, які загинули через 6-8 діб після зараження, переважали порушення кровообігу в легеневій тканині: наповнення альвеол еритроцитами та/або фібрином, відшарування епітелію.

Таблиця 1. Визначення антигену *S. trachomatis* у частинах органів тварин.

Назва дослідної групи	Вид зразка	Оптична щільність критична	Оптична щільність зразка	Результат
Тварини інфіковані штамом Arl-Z	10% завись легені	0,35 о.о.*	1,030	Позитивний
	1% завись легені		0,168	Негативний
	10% завись серця		0,105	Негативний
	10% завись печінки		0,400	Позитивний
	10% завись селезінки		0,237	Негативний
Тварини інфіковані штамом Ar2-K	10% завись жегені		1,949	Позитивний
	1% завись легені		1,266	Позитивний
	10% завись селезінки		0,639	Позитивний
	10% завись серця		0,186	Негативний
	1% завись печінки		0,494	Позитивний
Тварини інфіковані штамом Ku	10% завись легені		1,141	Позитивний
	10% завись печінки		0,615	Позитивний
	1% завись легені		0,272	Негативний

	10% завись серця		0,177	Негативний
	10% завись селезінки		0,235	Негативний
Інтактні тварини	10% завись легені №1		0,181	Негативний
	10% завись легені №2		0,100	Негативний
	10% завись легені №3		0,067	Негативний
	10% завись печінки №1		0,073	Негативний
	10% завись печінки №2		0,072	Негативний
	10% завись печінки №3		0,049	Негативний

*О.О- оптична одиниця.

Для перевірки етіологічної ролі цих штамів *S. trachomatis* та патології загиблених мишей була проведена полімеразна ланцюгова реакція з виявленням ДНК збудника. Для дослідження випадковим чином відбирали зразки органів померлих інфікованих та обезголовлених інтактних тварин. У результаті проведених досліджень переконливо підтверджено етіологічну роль цих лабораторних штамів *S. trachomatis* у виникненні патології загиблених тварин.

Також для визначення антигену *S. trachomatis* в частинах органів загиблених та інтактних тварин. проведено селективний імуноферментний аналіз. Слід зазначити, що при відборі органів більшість з них призначалася для гістологічного дослідження і не завжди можна було виділити ділянки, які макроскопічно виглядали ураженими (крововиливи, ділянки некрозу тощо) без пошкодження структури. Особливо це стосується тих органів, які мають невеликі розміри (селезінка, серце).

У ході досліджень встановлено, що всі досліджені штами *S. trachomatis* мають здатність ініціювати запальні процеси різного ступеня вираженості та спричиняти певні фітоморфологічні, патофізіологічні та клінічні зміни у тварин. Узагальнюючи отримані результати, слід навести коротку характеристику їх патогенних властивостей.

При інтраназальному та інтраабдомінальному методі посіву Ag1-2 спостерігалось поступове наростання симптомів та повільний перебіг захворювання. Кількість загиблених тварин становила 16,7%, термін смерті був пізнім, інвазійні властивості в тканинах легенів і печінки виражені слабо, дисемінації збудника в інші органи тварини за результатами гістологічного, імунологічного дослідження не відзначено. та мікроскопічні дослідження. За наведеними характеристиками штам Ar1-Z є слабовірулентним. Визнано штам Ag2-K. суглобовий ізолят відрізнявся від попереднього за патогенними властивостями. Інтраназальна інфекція мишей викликана важкий патологічний процес у легенях з розвитком інтерстиціальної пневмонії та бронхіту, що призвело до швидкої загибелі тварин, що настала на 4-9 добу. Гістопатологічні зміни вражали як провідну, так і респіраторну частини легень з численними перибронхіальними інфільтратами, розплавленням міжальвеолярних перегородок та змінами легеневої тканини у вигляді червоного печіння. Летальність тварин досягала 75,0%. За допомогою гістологічних та молекулярно-біологічних досліджень у окремих тварин визначено ураження тканин серця. При внутрішньоочеревинному інфікуванні дисемінація збудника призводила до патологічного ураження тканин печінки та селезінки з наступною загибеллю мишей. Підсумовуючи вищесказане, штам Ar2-K має патогенні властивості з високим ступенем вірулентності. Штам Kі також визнаний етіопатогеном запальних захворювань, що виникли у тварин внаслідок інфікування, що призвело до загибелі 41,7% мишей. Перебіг захворювання характеризувався повільним розвитком, середньої тяжкості та настанням летального результату в пізньому періоді. Спостерігалися порушення кровообігу в легеневій тканині, виявлені випадки масивної лейкоцитарної інфільтрації міжальвеолярних перегородок, іноді незначні порушення структури ендокарда. Таким чином, результати, отримані під час експериментального дослідження вказують на те, що ці лабораторні штами *S. trachomatis* показали потенційну здатність ініціювати інфекційний процес у білих безпородних мишей, які виявилися сприйнятливою моделлю для вивчення патогенності різних шляхів зараження.

Висновки до розділу 3

1. Визначено морфокультуральні відмінності властивостей досліджених штамів з наявними різницями у множинності інфікування клітинного моношару, інтенсивності розвитку збудників, термінах формування внутрішньоклітинних включень, динаміці експансії паразитофорних вакуолей в уражених клітинах і початку процесів генерації нових поколінь, що підтверджує наявність індивідуальних штамових відмінностей на рівні повного циклу розвитку з відмінностями по його тривалості між вивченими збудниками.
2. Встановлено значні розбіжності у метаболічній активності штамів з вищими показниками утилізації глюкози та термінів початку активного розвитку штамів, утворення та наступного зменшення рибози для збудників, що мають більший патогенний потенціал. В цілому це обумовлює посилення конструктивних процесів у хламідій і сприяє їх інтенсивному розвитку.
3. Показано, що патогенні властивості досліджених штамів значно різняться між собою за ступенем виразності як для курячих ембріонів, що розвиваються, так і для дрібних лабораторних тварин.
4. Доведено, що наявність більш інтенсивних процесів розвитку та метаболічної активності хламідій у культурах клітин, нарівні зі здатністю вилучених збудників до ініціації захворювання, збігається з обтяженим перебігом хвороби та більш частими смертельними наслідками інфекційного процесу у експериментальних тварин.

ВИСНОВКИ

1. Аналіз літературних джерел щодо сучасних уявлень відносно біологічних властивостей унікальних внутрішньоклітинних паразитів порядку Chlamidiales демонструє, що дані патогени є динамічною системою мікроорганізмів з широким спектром фенотипових ознак, які не завжди стабільні в межах одного виду. Виявлено існування мутантних штамів, які мають підвищену патогенність. Надзвичайно важливі дослідження, що спрямовані на встановлення взаємозв'язку вірулентних властивостей штамів і особливостей перебігу захворювання. Особливе місце займає удосконалення мікробіологічного дослідження вилучених ізолятів з різноманітного біоматеріалу.
2. Найбільш ефективним об'єктом для вилучення чистих культур хламідій виявилися проби уражених клітин уретриу вигляді зішкрябного матеріалу та синовіальна рідина. Переважну більшість штамів (70%), що відносяться до колекції тест-культур хламідій, ізолювано з цього біоматеріалу.
3. Для повного мікробіологічного дослідження хламідій є необхідним комплексне використання сучасних методичних підходів: додаткове внесення у поживне середовище незамінних амінокислот та цинку, що стимулює метаболізм збудника і підвищує їх життєздатність при перенесенні його у курячі ембріони. Це підсилює та оптимізує можливість отримання життєздатних лабораторних штамів хламідій у результаті швидкої адаптації.
4. Для більш точного встановлення діагнозу необхідно ввести так званий "подвійний золотий стандарт" у лабораторній діагностиці урогенітального хламідіозу, тобто використовувати два незалежні методи: ПЛР та імуноферментний аналіз; посів та імуноферментний аналіз.
5. Визначено морфокультуральні відмінності властивостей досліджених штамів з наявними різницями у множинності інфікування клітинного моношару, інтенсивності розвитку збудників, термінах формування внутрішньоклітинних включень, динаміці експансії паразитофорних

вакуолей в уражених клітинах і початку процесів генерації нових поколінь, що підтверджує наявність індивідуальних штамових відмінностей на рівні повного циклу розвитку з відмінностями по його тривалості між вивченими збудниками.

6. Встановлено значні розбіжності у метаболічній активності штамів з вищими показниками утилізації глюкози та термінів початку активного розвитку штамів, утворення та наступного зменшення рибози для збудників, що мають більший патогенний потенціал. В цілому це обумовлює посилення конструктивних процесів у хламідій і сприяє їх інтенсивному розвитку.
7. Показано, що патогенні властивості досліджених штамів значно різняться між собою за ступенем виразності як для курячих ембріонів, що розвиваються, так і для дрібних лабораторних тварин.
8. Доведено, що наявність більш інтенсивних процесів розвитку та метаболічної активності хламідій у культурах клітин, нарівні зі здатністю вилучених збудників до ініціації захворювання, збігається з обтяженим перебігом хвороби та більш частими смертельними наслідками інфекційного процесу у експериментальних тварин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ніконюк Т. Р., Бенюк В. О. Бактеріальний вагіноз. Сучасні підходи до діагностики та лікування. Новини медицини та фармації. 2007. № 1 (205).
2. Веропотвелян Н. П., Веропотвелян П. Н., Пухальська І. Н. Бактеріальний вагіноз: сучасні підходи до лікування. Медичні аспекти здоров'я жінки. 2010. № 9-10 (38-39). С. 68-74.
3. Майоров М. В., Жученко С. І., Черняк О. Л. Бактеріальний вагіноз: практичні етіології, діагностики та лікування. Медичні аспекти здоров'я жінки. 2014. № 2 (76). С. 55-61.
4. Методиодержаннячистих культур хламідій / В. В. Кутова, В. В. Гончаренко, С. К. Джораєва, О. В. Щоголева, В. О. Савоськіна // Тез.док. научно-практ. конф. "Современные аспекты эпидемиологии, иммуногенеза, иммунодиагностики, иммунотерапии хламидиоза и инфекций TORCH- комплекса" (2006 р., г. Киев) в журн. Імунологія та алергологія. - 2006. - № 4. - С. 99-100.
5. Особливості культивування збудників хламідіозів на перещеплюваній лінії клітин McCoу з використанням амінокислот / В. В. Гончаренко, С. К. Джораєва, І. Ю. Кучма, І. Г. Гайдучок, А. Л. Мельник, С. В. Пилюгін, А. Ю. Волянський, Т. О. Волков, С. М. Лахман, О. Е. Первомайська // Мат. міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні аспекти розробки, виготовлення, контролю якості та застосування ветеринарних імунобіологічних препаратів на основі сучасних біотехнологій» 30 травня-3 червня 2011 р. м. Алушта, АР Крим, у журн. Ветеринарна медицина міжвідомчий тематичний науковий збірник 2011. - випуск 95 С. 333-335.
6. Патогенез, діагностика і терапія уrogenитального хламидиоза / В. А. Исаков, Л. Б. Куляшова, Л. А. Березина [та ін.]. — СПб. 2010. — 112 с.
7. Рациональні підходи до бактеріологічної діагностики хламідіозів / В. В. Гончаренко, С. К. Джораєва, В. В. Кутова, О. М. Білоконь // Мат. Всеукраїнської наук. практ. конференції з міжнародним участю «Діагностика і лікування в дерматовенерології та косметології», 9-10 вересня 2010 г. Херсон в журн. Журнал дерматовенерології та косметології ім. М. О. Торсуєва. - 2010. - № 3-4 (22). - С. 94-95.
8. Розповсюдженість хламідійної інфекції серед хворих з сечостатевою патологією / В. В. Кутова, О. В. Щоголева, В. В. Гончаренко, С. К. Джораєва, І. В. Усік // Мат. Всеукраїнської наук.-практ. конф. з міжнарод. участю «Проблемні питання терапії тяжких шкірних хвороб та ускладнених інфекцій сечостатевої сфери» 20 травня 2010. Донецьк. в журн.

- Журнал ДерматовенерологіїКосметологіїім. М.О.Торсуєва. - 2010. - № 1-2.-С. 161-162.
9. Удосконаленняметодівотриманняштамівхламідій / В. В. Кутова, В. В. Гончаренко, С. К. Джораєва, О. В. Щоголева // Методиотриманнячистих культур мікроорганізмів та їхдовгостроковогозберігання в колекціях. 2004.- Вип. 3. - С. 80-84.
 10. Ультраструктурніособливостілабораторнихштамівхламідій / В. В. Гончаренко, В. В. Кутова, С. К. Джораєва [та ін.] // Журнал дерматології та венерології, 2011.-№1 (51) С. 53-59.
 11. Шеремета В. В. Персистуючахламідійнаурогенітальнаінфекція: фактори і механізми виникнення, обґрунтуваннядоцільностіпроведенняподальшихдосліджень / В. В. Шеремета, М. М. Лебедюк // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол. - 2002. - Т.2, № 5. - С. 63-67.
 12. Abdelrahman Y. M. The chlamydial developmental cycle / Y. M. Abdelrahman, R. J. Belland // FEMS Microbiol. Rev. 2005. Vol. 29. P. 949- 959.
 13. Abromaitis S. Attachment and entry of Chlamydia have distinct requirements for host protein disulfide isomerase/S. Abromaitis, R. S. Stephens // PLoS Pathol.-2009.-№ 5-P. 1000-1357.
 14. Blackwell A. L., Thomas P.D., Wareham KL., Emery S.L.Health gains fromscreening infection of the lower genital tract in women attending fortermination of pregnancy ./Lancet- 1993.- vol.342, -p.206-210.
 15. Bragina E.E., Gomberg M.A., Dmitriev G.A. Electron Microscopic evidence of persistant chlamydial infection following treatment. //JEADV.- 2001.-vol.15.- p.405-409.
 16. Bush R. M. Molecular evolution of the Chlamydiaceae / R. M. Bush, K. D. E. Everett // Int. J. Syst. Evol. Microbiol.-2001.- № 51.-P. 203-220.
 17. Byrne G. I. Chlamydia trachomatis strains and virulence: rethinking links to infection prevalence and disease severity / G. I. Byrne // J. Infect. Dis. - 2010. - Vol. 201.-P. 126-133.
 18. Cates W. Jr., Rolfs R. T Jr., Aral S.O. Sexually transmitted diseases, pelvic inflammatory disease, and infertility: an epidemiologic update.//Epidemiol.Rev.-1990.-№ 12.-p. 199-220.
 19. Clad A.,PrillwitzJ.,Hintz K.C. et al. Discordanat prevalence of Chlamydia trachomatis in asymptomatic couples screened using urine ligase chain reaction./Eur.J.Clin.Microbiol.Infecrt.Dis.- 2001.- vol.20, -p.324-328.
 20. Differential expression of three Chlamydia trachomatis hsp60-encoding genes in active vs. persistent infections / H. C. Gerard, J. A. Whittum-Hudson, H. R. Schumacher [et al.] // Microb. Pathog. - 2004. - № 36. - P. 35-39.

21. Epidemiology and clinical manifestations of unique *Chlamydia trachomatis* isolates that occupy nonfusogenic inclusions/ W. M. Geisler, R. J. Suchland, D. D. Rockey [et al.] // *J. Infect. Dis.* 2001.- Vol. 184.-P. 879-884.
22. Fadel S. *Chlamydia trachomatis* OmeB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesion / S. Fadel, A. Eley // *J. Med. Microbiol.* - 2007.-Vol. 56.-P. 15-22.
23. Genetic differences in the *Chlamydia trachomatis* tryptophan synthase α - subunit can explain variations in serovar pathogenesis / A. C. Shaw, G. Christiansen, P. Roepstorff [et al.] // *Microbes Infect.* - 2000. - № 2. - P. 581-592.
24. Hybiske K. Mechanisms of *Chlamydia trachomatis* entry into nonphagocytic cells / K. Hybiske, R. S. Stephens // *Infection & Immunity.* - 2007. - Vol. 75, № 3.-P.3925-3934.
25. Isolates of *Chlamydia trachomatis* that occupy nonfusogenic inclusion lack Inc A, protein localized to the inclusion membrane / R. J. Suchland, D. D. Rockey, J. P. Bannantine [et al.] // *Infection & Immunity* - 1999. - Vol. 68, № 1.-P. 360-367.
26. Miyashita N. The morphology of *Chlamydia pneumoniae* / N. Miyashita, Y. Kanamoto, A. Matsumoto // *J. Med. Microbiol.* 1993. -Vol. 38. P. 418-425.
27. Molecular characterization and subcellular localization of macrophage infectivity potentiator, a *Chlamydia trachomatis* lipoprotein/L. Neff, S. Dahar, P. Muzzin [et al.] // *J. Bacteriol.* 2007. - Vol. 189.-P. 4739-4748.
28. Morrison S.G. and Morrison R.P. Resolution of secondary *Chlamydia trachomatis* genital tract infection in immune mice with depletion of both CD4+ and CD8+ T cells.// *Infect.Immun.*-2001.- v.69.- p.2643-2349.
29. Polymorphisms in *Chlamydia trachomatis* tryptophan synthase genes differentiate between genital and ocular isolates / H. D. Caldwell, H. Wood, D. Crane [et al.] // *J. Clin. Investig.* - 2003. - Vol. 111. – P. 1757-1769.
30. Polymorphisms in the nine polymorphic membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* across all serovars: evidence for serovar Da recombination and correlation with tissue tropism/J. P. Gomes, A. Nunes, W. J. Bruno [et al.] // *J. Bacteriol.*2006. Vol. 188. P. 275-286.
31. Population-based genetic and evolutionary analysis of *Chlamydia trachomatis* urogenital strain variation in the United States / K. Millman, C. M Black, R. E. Johnson [et al.] // *J. Bacteriol.* 2004, Vol. 186.-P. 2457-2465.
32. Rahman M.U., Cheema M.A., Schumacher H.R., Hudson A.P. Molecular evidence for the presence of chlamydia in the synovium of patients with Reiter's syndrome.//*Arthr.Rheum.*-1992.-vol.35.-p.521-529.
33. Ridgway G.L. Treatment of chlamydial genital infection. // *J.Antimicrobal.. Chemother.*-1997.-vol.40.-p.311-314.

34. Ripa T. A *Chlamydia trachomatis* strain with a 377-bp deletion in the cryptic plasmid causing false-negative nucleic acid amplification tests/T. Ripa, P. A. Nilsson // *Sex. Transm. Dis.* - 2007. № 34. – P. 255-256.
35. Schachter J. Infection and disease epidemiology. In: *Chlamydia: intracellular biology, pathogenesis, and immunity* / Edited by R. S. Stephens. -- Washington DC: American Society for Microbiology, 1999. - Chapt. 6. - P.139- 169.
36. Schachter J. The *Chlamydia trachomatis* plasmid deletion mutant: what does it mean to us?/J. Schachter // *Sex. Transm. Dis.* 2007, № 34, P. 257.
37. Stary A., Schuh E., Kerschbaumer M. et al. Performance of transcriptionmediated amplification and ligase chain reaction assays for detection of chlamydial infection in urogenital samples obtained by invasive and noninvasive methods.// *J. Clin. Microbiol.*- 1998.- vol. 36. - p. 2666-2670.
38. Stephens R.S. *Chlamydia. Intracellular Biology, Pathogenesis and Immunity.*//Washington., ASM Press.-1999.- p. 143-146.
39. Su H., Feizler K., Caldwell H.D., Morrison R.P. *Chlamydia trachomatis* genital tract infection of antibody-deficient gene knockout mice.//*Infect.Immun.*-1997.- vol.65.-p.1993-1999.
40. Tait J., Peddie B., Bailey R.R. et al. Evidence of *Chlamydia trachomatis* infection. // *Br. J. Urol.*- 1985.- vol.57.- p.552-556.
41. Taylor-Robinson D., Gilroty C.B. Thopmas B.J., Keal ACS. Detection of *Chlamydia trachomatis* DNA in joints of reactive arthritis patients by polymerase chain reaction.//*Lancet.*- 1992.-vol.340.p.81-82.
42. Tenover F.C. Global problem of antimicrobial resistance.// *Pharm World Sci.*- 1995.-vol.17(5).- p.149-151.
43. The *Chlamydia trachomatis* plasmid is a transcriptional regulator of chromosomal genes and virulence factor/ J. H. Carlson, W. M. Whitmore, D. D. Crane [et al.] // *Infect. Immun.* - 2008. - Vol. 76.-P. 2273-2283.
44. The natural history and immunodiagnosis of *Chlamydia trachomatis* genital infection and implications for *Chlamydia* control/S. L. Gottlieb, R. C. Brunham, G. 1. Byrne [et al.] // *J. Infect Dis.* - 2010. - Vol.201, № 52. - P. 85-88.
45. Toivanen A. Reactive arthritis &Reiter"ssyndrome : history and clinical features.//In:KlippelJ.H.,Dieppe P.A. eds. *Rheumatology*- 1998- vol.2 - p.18.
46. Ultrastructural and molecular analyses of the persistence of *Chlamydia trachomatis* (serovar K) in human monocytes L. Kochler, E. Nettelbreker, A. P. Hudson [et al.] // *Microb. Pathog.*-1997.-Vol. 22, №3.-P. 133-142.
47. Use of a quantitative gene expression assay based on micro-array techniques and a mathematical model for the investigation of chlamydial generation time/D. P. Wilson, S. Mathews. C. Wan [et al.] // *Bull. Math. Biol.* - 2004. - Vol. 66.-P. 523-527.

48. Use of the broad range PCR assay for the identification and classification of bacteria in the order Chlamydiales / A. Meijer, J. M Roholl, J. M. Ossewaarde. // Proceedings 4th Meeting of the European Society Chlamydia Research Aug. 20-23, 2000: Helsinki (Finland), 2000. - P.9.
49. Whittington W.L., Kent C, Kissinger P., et al. Determinants of persistent and recurrent Chlamydia trachomatis infection in young women: results of a multicenter cohort study.// Sex Transm. Dis.- 2001.-vol. 28.- № 2.- p.117-123.
50. Wollenhaupt J., Hammer M., Pott H.G., Zeidler H. A double-blind, placebocontrolled comparison of 2 weeks versus 4 months treatment with doxycycline in chlamydia-induced reactive arthritis. //Arthr.Rheum.1997.vol40(suppl.)-p.143.
51. World Health Organization // Global Prevalence and incidence of Selected Curable Sexually Transmitted infections. Overview and Estimates/ Geneva:WHO 2001. P.189-199.
52. Wyrick P. B. Chlamydia trachomatis persistence in vitro: an overview / P. B. Wyrick // J. Infect Dis.- 2010.- Vol.201, № 52.-P. 88-96
53. Wyrick P. B. Intracellular survival by Chlamydia: microreview / P. B. Wyrick // Cellular Microbiology./2000.- Vol. 2, № 4. - P. 275-282.

ДОДАТКИ

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

YOUTH PHARMACY SCIENCE

МАТЕРІАЛИ

**IV ВСЕУКРАЇНСЬКОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ
З МІЖНАРОДНОЮ УЧАСТЮ**

6-7 грудня 2023 року м. Харків

Харків НФаУ 2023

УДК 615.1

Редакційна колегія: проф. Котвіцька А. А., проф. Владимірова І. М.

Укладачі: Сурікова І. О., Боднар Л. А.

Youth Pharmacy Science: матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (6-7 грудня 2023 р., м. Харків). – Харків: НФаУ, 2023. – 652 с.

Збірка містить матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Youth Pharmacy Science», які представлені за пріоритетними напрямками науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету. Розглянуто теоретичні та практичні аспекти синтезу біологічно активних сполук і створення на їх основі лікарських субстанцій; стандартизації ліків, фармацевтичного та хіміко-технологічного аналізу; вивчення рослинної сировини та створення фітопрепаратів; сучасної технології ліків та екстемпоральної рецептури; біотехнології у фармації; досягнень сучасної фармацевтичної мікробіології та імунології; доклінічних досліджень нових лікарських засобів; фармацевтичної опіки рецептурних та безрецептурних лікарських препаратів; доказової медицини; сучасної фармакотерапії, соціально-економічних досліджень у фармації, маркетингового менеджменту та фармакоекономіки на етапах створення, реалізації та використання лікарських засобів; управління якістю у створення, виробництва й обігу лікарських засобів; інформаційно-освітніх технологій у фармації та медицині; суспільствознавства; філології.

УДК 615.

© НФаУ, 2023

Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю
«YOUTH PHARMACY SCIENCE»

МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА УРОГЕНІТАЛЬНОГО ХЛАМІДІОЗУ

Артюшенко А.М. Науковий керівник: Тіщенко І.Ю.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

alonaartusenko477@gmail.com

Вступ. У даний час на особливу увагу заслуговує проблема урогенітальної інфекції. Найчастіше статева інфекція буває зумовлена декількома патогенними факторами – вірусами, мікробами, грибами, найпростішими, які викликають схожі за клінічною течією, але різні за патогенезом та методами лікування захворювання. До однієї з інфекцій сечостатевого тракту, що найчастіше діагностуються, відноситься хламідіоз – сексуально-трансмівна інфекція, що веде до розвитку запальних захворювань урогенітальної системи і органів малого тазу і надає значний вплив на репродуктивну функцію. За оцінками ВООЗ (Всесвітня організація охорони здоров'я), хламідіоз посідає друге місце після урогенітального трихомоніазу серед інфекцій, що передаються статевим шляхом.

Хламідії виявляються у кожної другої жінки з хронічними запальними процесами сечостатевої системи, у 70-80% – зі звичним невиношуванням, у 40-50% – з безпліддям трубним. За даними дослідників і ВООЗ, щорічно на урогенітальний хламідіоз хворіє приблизно 100 млн осіб, а кількість усіх інфікованих у світі сягає 1 млрд. Водночас широкого поширення набули безсимптомні й атипові форми захворювання. Тому вибір ефективної діагностики на хламідіоз є одним з актуальних питань у сучасній венерології.

Мета дослідження. Аналіз мікробіологічних методів діагностики урогенітального хламідіозу та виявлення найбільш ефективних методів дослідження збудників хламідіозу.

Матеріали та методи. Матеріал для дослідження: урогенітальні ізоляти, вилучені із зішкрябного матеріалу уретри та цервікального каналу хворих з запальними захворюваннями сечостатевої системи. Одним з відповідальних етапів діагностики хламідійної інфекції є правильний забір матеріалу. При взятті клінічних проб на хламідії важливо враховувати, що збудник вибірково вражає циліндричний епітелій сечостатевих шляхів.

Методи дослідження: культуральний (виділення хламідій в культурах клітин), мікробіологічний (виділення хламідій в 6-7 денних курячих ембріонах), цитоморфологічний (визначення морфологічних структур хламідій в препаратах клітинних культур та мазках-відбитках жовткових оболонок курячих ембріонів), імунолюмінесцентний (визначення специфічного хламідійного антигену), молекулярно-біологічні методи ідентифікації збудника – ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція), електронно-мікроскопічний (вивчення ультраструктурних особливостей хламідій), імуноферментний (визначення наявності антигену хламідій у зразках), статистичний (стандартний пакет прикладних програм для медико-біологічних досліджень).

Результати дослідження. Важливу роль у справі боротьби з урогенітальним хламідіозом грає якісна та своєчасна діагностика цього захворювання. Однак лабораторна діагностика хламідіозу і сьогодні вважається досить складною. Слід зазначити, що для дослідження в основному беруть не мазок, а зішкріб (кліт хворого органу). Також для аналізу використовується кров, сеча і сперма. Точність вибраного аналізу варіюється від 15% до 100% залежно від методу, що використовується. Сьогодні наразі для виявлення *Chlamydia trachomatis* застосовується шість основних тестів: мазок (зішкріб), РІФ, аналіз ПЛР на хламідії, посів на хламідії, ІФА й тест-смужки.

Мікроскопічний аналіз – це вид лабораторного дослідження, який полягає у взятті загального мазка: у жінок – з шийки матки, піхви та зовнішнього отвору сечовипускного каналу, у чоловіків – з уретри. Його перевагою є невисока

вартість. Але ймовірність виявлення хламідій таким способом становить усього 15%. Через це деякі дерматовенерологи не рекомендують мікроскопічний метод діагностики для встановлення діагнозу «хламідіоз».

Тест-смужки дозволяють швидко отримати результат, перевагою є вартість, проте точність не перевищує 20%.

Для застосування реакції імунної флюоресценції (РІФ) матеріал для дослідження беруть з цервікального каналу або уретри, після чого аналізують під флюоресцентним мікроскопом. Точність тесту РІФ становить до 50%. Для виявлення інфекції за допомогою цієї методики необхідно, щоб аналізованого матеріалу було багато, а захворювання перебувало в активній фазі. Також можливі хибнопозитивні результати. Тому такий тип діагностики, як реакція імунної флюоресценції, не рекомендують використовувати з метою пошуку *Chlamydia trachomatis*.

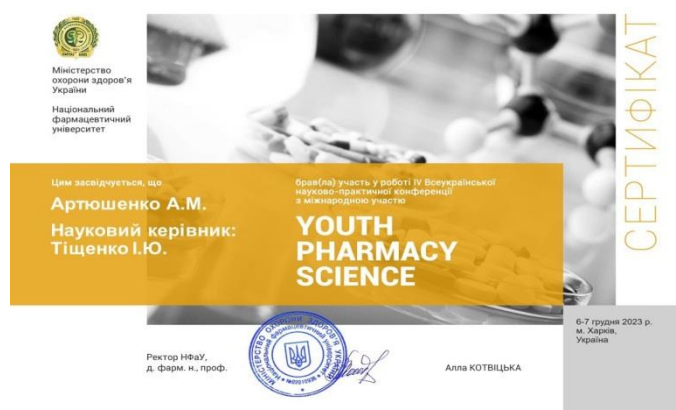
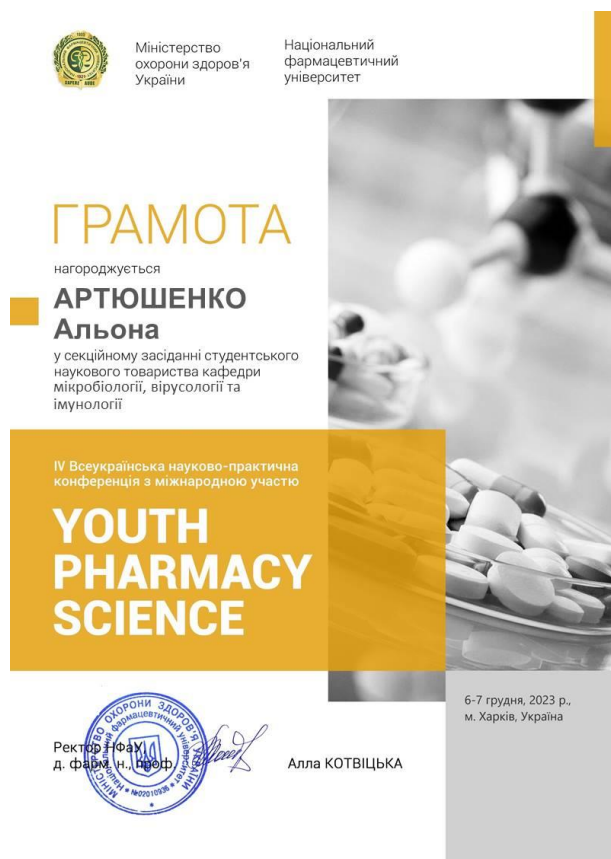
Імуноферментний аналіз (ІФА) дозволяє визначити антитіла до хламідій: IgM, IgA, IgG. Перевага методу – він не тільки виявляє інфекцію, але й повідомляє, у якій стадії перебуває хвороба – гострій чи хронічній. Недолік ІФА-аналізу на хламідіоз – низька чутливість. За даними різних дослідників, вона становить до 78%. Підвищення точності тесту (понад 90%) можливе лише в разі високого вмісту антигену в досліджуваному матеріалі. Водночас низький вміст антигену й різко знижує чутливість методу (точність тесту становить менш ніж 60%).

Посів на хламідій – це метод виділення *Chlamydia trachomatis* на культурі клітин. Основна перевага – висока точність (виявлення хламідій у 75-90% випадків) і можливість одразу визначити, до яких антибіотиків чутлива інфекція. Проте посів не дає змогу встановити діагноз приблизно у 20-25% жінок з хламідійними цервіцитами та у 10-15% чоловіків з хламідійною інфекцією уретри. Також недоліками аналізу є висока ціна, трудомісткість і тривале очікування результату (зазвичай 3-7 днів). Раніше посів вважався «золотим стандартом» у виявленні хламідіозу. Сьогодні ж культуральний метод рекомендується поєднувати з методами ДНК-діагностики, підтверджуючи негативний результат посіву за допомогою ПЛР-тесту на хламідії.

Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) ґрунтується на виявленні специфічних для *Chlamydia trachomatis* послідовностей ДНК або рибосомальної РНК. В останні роки успішно застосовується ПЛР у режимі реального часу (ПЛР-РВ, Real-Time PCR). Основні переваги генної діагностики – висока точність аналізів, швидкість, чутливість тесту – до 95%. Метод ПЛР дозволяє визначати збудника незалежно від локалізації інфекційного процесу і виявляти патоген у період серологічного вікна.

Висновки. Відповідно до рекомендацій ВООЗ найкращим методом діагностики хламідійних уражень урогенітального тракту є виділення збудника на культурі клітин, оброблених метаболітами. Цей метод має найбільшу специфічність і достовірність. Його можна застосовувати як тест, що визначає ступінь ефективності проведеного лікування. Однак є ряд факторів, які знижують ймовірність виявлення хламідій у культурі клітин. До них відноситься прийом антибіотиків, отже, необхідно виключити з обстеження осіб, які приймали антимикробні засоби протягом останнього місяця. Ступінь виявлення хламідій зростає пропорційно до тривалості існування запального процесу. Важливу роль грає спосіб і якість забору клінічного матеріалу від хворого, а також час, що проходить між взяттям зразків та поміщенням їх у культуру клітин. Таки́н, у практичних умовах для діагностики хламідіозу доцільним постановка ІФА з моноклональними антитілами та метод виділення збудника в культурі клітин.

Також важливо врахувати, що негативний результат у жінок з безпліддям не завжди говорить про відсутність інфекції. Тому для діагностики хламідіозу в жінок репродуктивного віку рекомендується застосування відразу двох незалежних діагностичних методів. Наприклад, ПЛР та ІФА або ПЛР і посіву. Такий підхід називають «подвійним золотим стандартом». Водночас підтвердження позитивного результату, отриманого цим методом, не потрібне. Методика рекомендована як найкраща у діагностиці хламідіозу.



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ КАФЕДРА МІКРОБІОЛОГІЇ,
ВІРУСОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ

MINISTRY OF HEALTH OF UKRAINE NATIONAL UNIVERSITY OF
PHARMACY
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY, VIROLOGY AND IMMUNOLOGY

**«СУЧАСНА АНТИМІКРОБНА ТЕРАПІЯ: ПРОБЛЕМИ ТА ШЛЯХИ
ВДОСКОНАЛЕННЯ»**

**MODERN ANTIMICROBIAL THERAPY: PROBLEMS AND WAYS OF
IMPROVEMENT**

Матеріали

**I Науково-практичної дистанційної конференції, 17 листопада 2023 року,
Харків**

**Materials of the 1st Scientific and Practical Remote Conference, Kharkiv,
November 17, 2023**

ХАРКІВ KHARKIV 2023

УДК: 579:578:61(06)

Редакційна колегія: проф. Котвіцька А.А., проф. Владимірова І.М, проф.
Філімонова Н.І., доц. Кошова О.Ю.

Конференція внесена до реєстру з'їздів, конгресів, симпозіумів та науково-практичних конференцій, які проводитимуться у 2023 році, реєстраційне посвідчення УкрІНТЕІ, № 557 від 19 грудня 2022 року.

«Сучасна антимікробна терапія: проблеми та шляхи вдосконалення» :

матеріали I Науково-практичної дистанційної конференції, 17 листопада 2023 року, Харків (м. Харків, 24 березня 2023 р., м. Харків) / – Х. : НФаУ, 2023. – 127 с.

Збірник містить матеріали науково-практичної міжнародної дистанційної конференції «Сучасна антимікробна терапія: проблеми та шляхи вдосконалення». Розглянуто актуальні питання фармацевтичної мікробіології, перспективи створення антимікробних препаратів, їх застосування в медичній практиці, вивчення антибіотикорезистентності мікроорганізмів та визначення шляхів її подолання, клінічної патофізіології та епідеміології інфекційних захворювань, клінічної імунології та алергології, досягнень вірусологічних, молекулярно-генетичних досліджень в лабораторній діагностиці, актуальні питання ветеринарної мікробіології, наукових досліджень з розробки антимікробних лікарських засобів, маркетингових досліджень сучасного фармацевтичного ринку хіміотерапевтичних препаратів.

Для широкого кола наукових, науково-педагогічних і практичних працівників, що займаються питаннями мікробіології, вірусології, імунології, алергології та фармації в цілому.

Матеріали подаються мовою оригіналу в авторській редакції. За достовірність матеріалів відповідальність несуть автори.

УДК: 579:578:61(06)

© НФаУ, 2023

UDC: 579:578:61(06)

Editorial Board: Prof. Kotvitska A.A., Prof. Vladimirova I.M., Prof. Filymonova N.I., Associate Professor Olena Koshova.

The Conference has been included in the list of meetings, congresses, symposia, and scientific-practical conferences to be held in 2023, registration certificate UkrInte № 557, dated Desember, 19, 2022.

"Modern antimicrobial therapy: problems and ways of improvement" :

materials of the 1st Scientific and Practical Remote Conference, Kharkiv (Kharkov, March 24, 2023, Kharkiv). – Electron. data. – Kharkiv: National University of Pharmacy, 2023. – 127 p.

The collection contains materials of scientific and practical international distant conference "Modern antimicrobial therapy: problems and ways of improvement". Shows the latest issues of pharmaceutical microbiology, prospects of antimicrobial drugs, their use in medical practice, antibiotic resistance of microorganisms and ways to counteract it, clinical pathophysiology and epidemiology of infectious diseases, clinical immunology and allergology, advances in virological, molecular genetic studies in laboratory diagnostics, current issues of veterinary microbiology, information technologies and automation of scientific research into antimicrobial medicines development, marketing research of modern pharmaceutical market of chemotherapeutic preparations.

For a wide range of scientists, educators and practitioners involved in microbiology, virology, immunology, allergology and pharmacy in general.

Materials are submitted in the original author's language. Authors are responsible for the authenticity of the materials.

UDC: 579:578:61(06)

© NPhaU, 2023

УРОГЕНІТАЛЬНИЙ ХЛАМІДІОЗ: МІКРОБІОЛОГІЧНА ОЦІНКА ПАТОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЗБУДНИКА

**Артюшенко А.М., Тіщенко І.Ю., Місюрьова С.В., Кошова О.Ю.,
Шаповалова О.В.**

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

microbiology@nuph.edu.ua

Вступ. В останні роки активно вивчається патогенез та клінічна симптоматика хламідійних уражень урогенітального тракту, нервової, кардіоваскулярної, опорно-рухової та бронхо-легеневої систем, продовжують розроблятися нові підходи та схеми лікування хворих, інфікованих хламідіями. Хламідійна інфекція протягом багатьох десятиків років є важливою та актуальною проблемою не тільки через високу поширеність, а й через велику частоту ускладнень, що негативно впливають на здоров'я населення та його демографічні показники. Хламідії викликають безліч захворювань, що призводять до хронізації запального процесу всіх органів та систем організму людини. Хламідіоз діагностується у 10-40% хворих з патологією сечостатевої та травної систем, у 25% хворих на гостру респіраторну інфекцію, у 5-10% хворих на

бронхіт і пневмонію. Урогенітальний хламідіоз є найпоширенішим захворюванням урогенітального тракту у жінок. Частота народження захворювання серед жіночого населення коливається, за даними різних авторів від 30 до 60%. Запальний процес хламідійної етіології протікає найчастіше безсимптомно, зі схильністю до хронізації та генералізації та вимагає проведення своєчасної діагностики внутрішньоклітинної бактеріальної інфекції та адекватного етіотропного комплексу лікувальних заходів.

Матеріали та методи. Збір первинного матеріалу для культуральних досліджень хламідій здійснювався від хворих з різноманітними проявами урогенітального хламідіозу у медичних закладах м. Харкова. Були викори наступні методи лабораторних досліджень: методи культуральної діагностики визначення морфологічних структур хламідійних включень в інфікованих клітинах моношару; визначення морфологічних структур хламідій у жовткових оболонках курячих ембріонів; біохімічні методи дослідження; молекулярно-біологічні методи ідентифікації збудника; імуноферментний аналіз для визначення антигену *C. trachomatis*; статистична обробка результатів дослідження.

Результати та обговорення. У багатьох лабораторіях пріоритетним на сьогоднішній день є метод виділення хламідій у культурі клітин, який прийнятий

за "золотий стандарт" діагностики хламідіозу. Найбільша чутливість та специфічність цього методу виявлення хламідій була відзначена багатьма дослідниками. Однак низка авторів відзначають межі чутливості цього методу. Так, К.Т.Ріре та співавтори відзначають, що метод не дозволяє встановити діагноз приблизно у 10-15% хворих чоловіків з хламідійною інфекцією уретри та у 20- 25% жінок з хламідійним цервіцитом. З існуючих методів цей метод найбільш трудомісткий і дорогий, що вимагає спеціального оснащення лабораторії, висококваліфікованого персоналу та дотримання спеціальних правил транспортування клінічного зразка для дослідження. Дослідження займає від 3 до

7 діб. Тільки спеціалізовані медичні установи можуть проводити подібні дослідження та гарантувати діагностичну точність методу.

Сьогодні актуальні та перспективні методи молекулярної діагностики засновані на визначенні специфічних для *C.trachomatis* послідовностей олігонуклеотидів ДНК або рибосомальної РНК. Новим прийомом ДНК- діагностики, який може обігнати за чутливістю решту методів молекулярної біології, є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). На думку ряду авторів, ПЛР подібна до чутливого імуноферментним аналізом, більш чутлива, ніж зараження клітинної культури... Однак, застосовуючи цей метод, слід враховувати, що крім звичайних для мікробіологічних лабораторій застережень, слід вживати заходів для запобігання присутності навіть слідів ДНК патогенів. Достовірність результатів залежить від якості взяття матеріалу для дослідження, його зберігання. Взяття матеріалу для встановлення вищевикладених методів в амбулаторних умовах здійснюється з нижніх відділів генітального тракту. Негативні результати досліджень трактуються багатьма клініцистами як відсутність уrogenітального хламідіозу у жінок. Проте, щоб уникнути інфікування верхніх відділів генітального тракту необхідні додаткові методи обстеження. Не слід забувати також про існування латентної форми перебігу хламідійної інфекції та наявність персистентних форм.

В даний час для діагностики всіх форм хламідійної інфекції широко використовуються імуноферментні методи виявлення антитіл до *C.trachomatis* з диференціюванням імуноглобулінів А, М, G. Для цих цілей використовують діагностичні набори фірм Medac Diagnostica (Німеччина), Labssystem (Фінляндія), Organics . Незважаючи на труднощі у ряді випадків інтерпретації, ці методи мають велике значення при епідеміологічних обстеженнях, особливо тих груп людей, які перебувають під найбільшим ризиком зараження хламідіями (молоді сексуально- активні жінки). Серологічні методи дозволяють виявити IgG, IgM, IgA. При гострій інфекції діагностичне значення має виявлення IgM-антитіл або встановлення конверсії IgG-антитіл при їх наростанні в 2 і більше разів.

Висновки. На підставі вищевикладеного нам видається, що для більш точного встановлення діагнозу необхідно ввести так званий "подвійний золотий

стандарт". Тобто для діагностики уrogenітального хламідіозу використовувати два незалежні методи: ПЛР та імуноферментний аналіз; посів та імуноферментний аналіз. Для встановлення діагнозу уrogenітальний хламідіоз необхідні: ретельно зібраний анамнез, збір скарг, гінекологічний огляд, лабораторне підтвердження, у разі потреби додаткові методи обстеження (УЗ органів малого тазу, кольпоскопія, діагностична лапароскопія). Неприпустимі постановка діагнозу та проведення терапії на підставі лише лабораторного обстеження. Тактика встановлення діагнозу уrogenітальний хламідіоз на підставі лабораторного обстеження призводить до значного коливання цифр про інфікованість населення хламідіями. Ці цифри, на жаль, не відображають справжнього стану речей.





Ф А 2.2.1-32-366

Національний фармацевтичний університет

Факультет медико-фармацевтичних технологій

Кафедра мікробіології, вірусології та імунології

Ступінь вищої освіти другий магістерський

Спеціальність 224 Технології медичної діагностики та лікування

Освітня програма Лабораторна діагностика

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

д.мед.н., проф. **Наталія ФІЛІМОНОВА**

" 7 " вересня 2023 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ

Альони АРТЮШЕНКО

Тема кваліфікаційної роботи: «Урогенітальний хламідіоз: мікробіологічна оцінка патогенних властивостей збудника», керівник кваліфікаційної роботи: Ірина ТИЩЕНКО, к.біол.н., затверджений наказом НФаУ від "01" листопада 2023 року № 242.

1. Строк подання здобувачем вищої освіти кваліфікаційної роботи: грудень 2023 р.
2. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: об'єкт досліджень – мікробіологічна оцінка патогенних властивостей збудника урогенітального хламідіозу; мета – вивчення патогенних властивостей збудника урогенітального хламідіозу і його мікробіологічна оцінка.
3. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): зміст; вступ; аналітичний огляд; об'єкти, матеріали та методи досліджень; аналіз та узагальнення результатів; висновки. Головні питання (завдання): провести виділення та ідентифікацію хламідій; охарактеризувати мікробіологічні властивості хламідій; дослідити морфофункціональні відмінності хламідій; визначити особливості метаболічної активності хламідій; проаналізувати сучасні методи лабораторної діагностики урогенітальної хламідійної інфекції; виявити патогенні властивості лабораторних штамів хламідій.
4. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень): результати епідеміологічних, бактеріологічних, молекулярно-генетичних, імунологічних та статистичних досліджень у вигляді 6 рисунків, 2 таблиць.

5. Консультанти розділів кваліфікаційної роботи

Розділ	Ім'я, ПРИЗВИЩЕ, посада консультанта	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
1.4. Основні біологічні характеристики <i>C. trachomatis</i>	Наталія ДУБІНІНА, доцент закладу вищої освіти кафедри мікробіології, вірусології та імунології	18.09.2023 р.	29.09.2023.р.
2.2.1.Методи культуральної діагностики	Ольга ШАПОВАЛОВА, доцент закладу вищої освіти кафедри мікробіології, вірусології та імунології	02.10.2023 р.	16.10.2023 р.
3.3. Характеристика патогенних властивостей лабораторних штамів хламідій.	Наталія ФІЛІМОНОВА, професор закладу вищої освіти кафедри мікробіології, вірусології та імунології	30.10.2023 р.	20.11.2023 р.

6. Дата видачі завдання 01.09.2023 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів кваліфікаційної роботи	Примітка
1	Формування напрямку наукового дослідження	з 04.09.2023 р. до 11.09.2023 р.	виконано
2	Аналітичний огляд літератури	з 12.09.2023 р. до 29.09.2023 р.	виконано
3	Вибір об'єктів і методів дослідження	з 02.10.2023 р. до 20.10.2023 р.	виконано
4	Розробка календарної схеми досліджень.	з 21.10.2023 р. до 30.10.2023 р.	виконано
5	Проведення досліджень, вивчення звітів та наукової літератури	з 31.10.2023 р. до 25.11.2023 р.	виконано
6	Оформлення кваліфікаційної роботи та списку використаних джерел	з 26.11.2023 р.	виконано

Здобувач вищої освіти

(Підпис)

Альона АРТЮШЕНКО

(Ім'я, ПРИЗВИЩЕ)

Керівник кваліфікаційної роботи

(Підпис)

Ірина ТІЩЕНКО

(Ім'я, ПРИЗВИЩЕ)

ВИТЯГ З НАКАЗУ № 242
по Національному фармацевтичному університету
від 01 листопада 2023 року

Затвердити тему, керівника та рецензента кваліфікаційної роботи здобувачу вищої освіти денної форми здобуття освіти факультету медико-фармацевтичних технологій НФаУ 2024 року випуску:

№ з/п	Прізвище, ім'я по батькові здобувача вищої освіти	Тема кваліфікаційної роботи (українською мовою)	Тема кваліфікаційної роботи (англійською мовою)	Керівник кваліфікаційної роботи	Рецензент кваліфікаційної роботи
1.	Артюшенко Альона Михайлівна	Урогенітальний хламідіоз: мікробіологічна оцінка патогенних властивостей збудника	Urogenital chlamydia infection: microbiological evaluation of the pathogenicity of the infectious agent	доц. Тіщенко І. Ю.	доц. Місюрьова С. В.

ПІДСТАВА: службова записка завідувача кафедри про затвердження теми кваліфікаційної роботи, керівника та рецензента.
 З оригіналом згідно:

Декан факультету медико-фармацевтичних технологій  О.І. Набока



ВИСНОВОК

Комісії з академічної доброчесності про проведену експертизу
щодо академічного плагіату у кваліфікаційній роботі
здобувача вищої освіти

№ 124462 від «23 » грудня 2023 р.

Проаналізувавши випускну кваліфікаційну роботу за магістерським рівнем здобувача вищої освіти денної форми навчання Артюшенко Альони Михайлівни, 2 курсу, _____ групи, спеціальності 224 Технології медичної діагностики та лікування, на тему: «Урогенітальний хламідіоз: мікробіологічна оцінка патогенних властивостей збудника / Urogenital chlamydia infection: microbiological evaluation of the pathogenicity of the infectious agent», Комісія з академічної доброчесності дійшла висновку, що робота, представлена до Екзаменаційної комісії для захисту, виконана самостійно і не містить елементів академічного плагіату (копіляції).

Голова комісії,
професор



Інна ВЛАДИМИРОВА

ВІДГУК

**наукового керівника на кваліфікаційну роботу другого (магістерського)
ступеня вищої освіти спеціальності 224 Технології медичної діагностики
та лікування**

Альони АРТЮШЕНКО

**на тему: «Урогенітальний хламідіоз: мікробіологічна оцінка патогенних
властивостей збудника»**

Актуальність теми. Серед інфекцій, що передаються статевим шляхом, особливе місце займає урогенітальний хламідіоз. Ця хвороба є важливою медико-соціальною проблемою не лише через високу поширеність, а й у зв'язку з великою частотою обумовлених ускладнень та несприятливих наслідків, що негативно впливають на репродуктивне здоров'я нації та демографічні показники. Захворювання вражає чоловіків, жінок, дітей, негативно впливає на репродуктивне здоров'я, може поширюватися на різні органи та системи. Серед ІПСШ урогенітальний хламідіоз займає друге рангове місце після трихомоніазу, значно випереджаючи сифіліс та гонорею. Оскільки ця інфекція часто протікає безсимптомно, то невиявлені бактеріоносії сприяють поширенню захворювання у суспільстві. Сьогодні існують певні складності з своєчасною діагностикою УГХ, що також може бути пов'язано з існуванням персистентних форм. Урогенітальний хламідіоз досі продовжує залишатися серйозною медичною проблемою. У жодному із розділів її вивчення точка не поставлена. Актуальними залишаються дослідження патогенних властивостей хламідій для подальшого визначення оптимальних методів діагностики та лікування.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість.

Практична цінність роботи полягає в глибокому аналізі сучасних науково-дослідних матеріалів, звітної документації спеціалізованих ЛПЗ. Проведено мікробіологічну діагностику збудника урогенітального хламідіозу і досліджено його патогенні властивості, що надає можливість отримати результати використати з метою оптимізації мікробіологічної діагностики

урогенітального хламідіозу й створення методичних розробок з дослідження уrogenітальної інфекції.

Оцінка роботи. В процесі виконання роботи Альона Артющенко отримала навички роботи з науковою літературою, збрала та ретельно проаналізувала великий обсяг інформаційних джерел за темою. Здобувачка вищої освіти проявила себе здібним та сумлінним працівником при роботі з інформаційно-науковими ресурсами, навчилася планувати, самостійно проводити та аналізувати результати дослідження, систематизувати їх та робити висновки. В процесі роботи продемонструвала здатність самостійно ставити та вирішувати наукові завдання.

Загальний висновок та рекомендації про допуск до захисту. Робота здобувачки вищої освіти Альони АРТЮШЕНКО на тему: «Урогенітальний хламідіоз: мікробіологічна оцінка патогенних властивостей збудника» є закінченою науковою працею, повністю відповідає вимогам, що висуваються до кваліфікаційних робіт ступеня вищої освіти магістр та рекомендована до захисту в Екзаменаційній комісії.

Науковий керівник _____ Ірина ТІЩЕНКО

08 грудня 2023р.

Ф А 2.2.1-32-356

РЕЦЕНЗІЯ

на кваліфікаційну роботу другого (магістерського) ступеня вищої освіти спеціальності 224 Технології медичної діагностики та лікування

Альони АРТЮШЕНКО

на тему: «Урогенітальний хламідіоз: мікробіологічна оцінка патогенних властивостей збудника»

Актуальність теми. Хламідійна інфекція протягом багатьох десятиків років є важливою та актуальною проблемою не тільки через високу поширеність, а й через велику частоту ускладнень, що негативно впливають на здоров'я населення та його демографічні показники. Хламідії викликають безліч захворювань, що призводять до хронізації запального процесу всіх органів та систем організму людини. Урогенітальний хламідіоз є найпоширенішим захворюванням урогенітального тракту у жінок. Запальний процес хламідійної етіології протікає найчастіше безсимптомно, зі схильністю до хронізації та генералізації та вимагає проведення своєчасної діагностики внутрішньоклітинної бактеріальної інфекції та адекватного етіотропного комплексу лікувальних заходів.

Теоретичний рівень роботи. Робота складена відповідно до вимог «Положення про порядок підготовки та захисту кваліфікаційних робіт у Національному фармацевтичному університеті»; містить передбачені розділи; зміст викладено логічно та послідовно; включає ілюстрації, в тому числі таблиці; висновки сформульовані відповідно до поставлених завдань, базуються на результатах дослідження; список використаних джерел представлений сучасною науковою вітчизняною та іноземною літературою.

Пропозиції автора по темі дослідження. Автор кваліфікаційної роботи визначає конкретні напрямки дослідження патогенних властивостей збудника урогенітального хламідіозу, досконало і всебічно аналізує всі переваги і недоліки мікробіологічних методів діагностики цієї інфекції. На підставі проведених досліджень автор формує дуже важливий висновок, що для більш точного встановлення діагнозу необхідно ввести "подвійний золотий стандарт" в діагностиці урогенітального хламідіозу - два незалежні м-ПЛР та імуноферментний аналіз; посів та імуноферментний аналіз.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість. Автором проведено виділення та ідентифікацію хламідій, охарактеризовано їх мікробіологічні властивості, досліджено морфофункціональні відмінності і особливості метаболічної активності збудника, ретельно та всебічно проаналізовано сучасні методи лабораторної діагностики урогенітальної хламідійної інфекції. Отримані результати можливо використати з метою оптимізації мікробіологічної діагностики урогенітального хламідіозу й створення методичних розробок з дослідження урогенітальної інфекції.

Недоліки роботи. Суттєвих зауважень щодо змісту та оформлення магістерської роботи немає. У роботі зустрічаються поодинокі орфографічні

та стилістичні помилки, можливо, трохи недостатньо ілюстративного матеріалу. Але вказані зауваження не впливають на загальну позитивну оцінку роботи та не зменшують її наукової та практичної значущості.

Загальний висновок і оцінка роботи. Робота являє собою закінчену, послідовну та логічно побудовану наукову працю. В цілому, за актуальністю, методичним рівнем, обсягом проведених досліджень, науковою та практичною цінністю кваліфікаційна робота Альони АРТЮШЕНКО на тему: «Урогенітальний хламідіоз: мікробіологічна оцінка патогенних властивостей збудника» відповідає вимогам, які висуваються до кваліфікаційних робіт, і може бути подана до захисту до Екзаменаційної комісії, а автор заслуговує заслугує на присвоєння другого (магістерського) рівня вищої освіти.

Рецензент _____ доцент Світлана МІСЮРЬОВА

«10» грудня 2023 р.

ВИТЯГ З ПРОТОКОЛУ № 11

засідання кафедри мікробіології, вірусології та імунології

від 20.12.23

м. Харків

« 20 » грудня 2023 р

Засідання проводилось з використанням ZOOM технологій з 12 год 00 хв по 12 год 50 хв.

Чисельний склад кафедри: 6 штатних науково педагогічних працівників,

ПРИСУТНІ: зав. каф., проф. Філімонова Н.І., доц. Гейдеріх О.Г., доц. Дубініна Н.В., доц. Тіщенко І.Ю., доц. Шаповалова О.В., доц. Кошова І.Ю.

СЛУХАЛИ: Про представлення до захисту в Екзаменаційній комісії
кваліфікаційної роботи на тему: **«Урогенітальний хламідіоз:
мікробіологічна оцінка патогенних властивостей збудника»** магістрантки
спеціальності 224 Технології медичної діагностики та лікування другого
курсу 2024 року
випуску **Артюшенко Альона Михайлівна**

(прізвище, ім'я, по-батькові)

Науковий керівник: доцент ЗВО кафедри мікробіології, вірусології та
імунології, к. біол. н., доцент **Ірина Тіщенко**

Рецензент: доцент ЗВО кафедри клінічної фармакології та клінічної
фармації, к.фарм.н., доцент **Світлана МІСЮРЬОВА**

В обговоренні кваліфікаційної роботи брали участь:

проф. Філімонова Н.І., доц. Тіщенко І.Ю., доц. Гейдеріх О.Г.,
доц. Шаповалова О.В., доц. Дубініна Н.В., доц. Кошова О.Ю.

ПОСТАНОВИЛИ: Рекомендувати до захисту в Екзаменаційній комісії
кваліфікаційну роботу магістрантки 2 курсу **Альони АРТЮШЕНКО.**

(прізвище, ім'я, по-батькові)

на тему: **«Урогенітальний хламідіоз: мікробіологічна оцінка
патогенних властивостей збудника»**

Голова _____ Наталія ФІЛІМОНОВА

Секретар _____ Олена КОШОВА

Ф А2.2.1-32-042

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ПОДАННЯ

**ГОЛОВІ ЕКЗАМЕНАЦІЙНОЇ КОМІСІЇ
ЩОДО ЗАХИСТУ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ**

Направляється здобувач вищої освіти Альона АРТЮШЕНКО до захисту
кваліфікаційної роботи
за галуззю знань 22 Охорона здоров'я
спеціальністю 224 Технології медичної діагностики та лікування
освітньою програмою Лабораторна діагностика
на тему: «Урогенітальний хламідіоз: мікробіологічна оцінка патогенних
властивостей збудника»

Кваліфікаційна робота і рецензія додаються.

Декан факультету _____ / Ольга НАБОКА /

Висновок керівника кваліфікаційної роботи

Здобувач вищої освіти Альона АРТЮШЕНКО виконала кваліфікаційну роботу відповідно до чинних вимог. Здобувачем вищої освіти у кваліфікаційній роботі було розкрито обрану тему у достатньому обсязі. Кваліфікаційна робота може бути представлена до захисту в Екзаменаційній комісії.

Керівник кваліфікаційної роботи

Ірина ТИЩЕНКО

«11» грудня 2023 р.

Висновок кафедри про кваліфікаційну роботу

Кваліфікаційну роботу розглянуто. Здобувач вищої освіти Альона АРТЮШЕНКО допускається до захисту даної кваліфікаційної роботи в Екзаменаційній комісії.

Завідувач кафедри
мікробіології, вірусології та імунології

Наталія ФІЛІМОНОВА

«12» грудня 2023 року

Кваліфікаційну роботу захищено

в Екзаменаційній комісії

« 16 » лютого 2024 р.

З оцінкою _____

Голова Екзаменаційної комісії,

доктор медичних наук, професор

_____ /Ірина РИЖЕНКО/