

УДК 616.98:579.882

Генерализация инфекции у больных с урогенитальным хламидиозом

Н.А. Зигангирова¹, И.М. Петяев², Ю.П. Пашко¹, Е.Ю. Моргунова¹,
Л.Н. Капотина¹, Л.В. Диденко¹, Т.И. Юдина¹, С.В. Шубин³, Э.К. Джикидзе⁴,
И.М. Аршба⁴, А.Л. Гинцбург¹

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия;

² Cambridge Therapeutics Ltd, Кембридж, Великобритания;

³ Институт ревматологии РАМН, Москва, Россия;

⁴ ГУ НИИ медицинской приматологии, Сочи-Адлер, Россия

При хламидийной инфекции нижних и верхних отделов мочеполовой системы, а также при другой ее локализации наблюдалась циркуляция *Chlamydia trachomatis* в крови больных. У 92,3% больных с подтвержденной хламидийной инфекцией в крови *C. trachomatis* была выявлена при использовании 2 тестов: культурального метода и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выявляемые в крови больных хламидии обладали инфекционными свойствами, что может указывать на наличие еще мало изученного гематогенного пути распространения *C. trachomatis* в организме. Изучение диагностической значимости детекции возбудителя в сыворотке крови показало, что при острой хламидийной инфекции нижних отделов мочеполовой системы возбудитель одинаково эффективно выявлялся как в тканях слизистой, так и в сыворотке крови. В случае хронических инфекций урогенитального тракта,

а также при экстрагенитальной патологии частота обнаружения *C. trachomatis* в сыворотке была существенно выше: в 22,5% случаев по сравнению с 6,4% в соскобном материале при хроническом течении инфекции и в 54,9% случаев по сравнению с 31,3% в соскобном материале у артрологических больных. Возможность выявления *C. trachomatis* в сыворотке крови в случае хронических и осложненных форм хламидиоза является принципиально новым подходом для прямого определения возбудителя вне зависимости от локализации очага инфекции. В равной мере такой диагностический подход обоснован и при скрининговых обследованиях бессимптомных больных.

Ключевые слова: *Chlamydia trachomatis*, урогенитальный хламидиоз, бактериемия, гематогенный путь, персистирующие формы хламидий.

Контактный адрес:
Наиля Ахатовна Зигангирова
Тел./ факс: 499 193 61 36
Эл. почта: zigangirova@mail.ru

Generalization of Genital Chlamydia Infection

N.A. Zigangirova¹, I.M. Petyaev², Yu.P. Pashko¹, E.Yu. Morgunova¹, L.N. Kapotina¹, L.V. Didenko¹, T.I. Yudina¹, S.V. Shubin³, E.K. Gikidze⁴, I.M. Arshba⁴, A.L. Gintzburg¹

¹ Research Institute of Epidemiology and Microbiology named under N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

² Cambridge Theranostics Ltd, Cambridge, UK

³ Institute of Rheumatology of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

⁴ Research Institute of Primate Medicine, Sochi-Adler, Russia

Our study showed that chlamydiae were present in the blood from patients with genital and other chlamydial infections. Blood samples tested were positive for *C. trachomatis* in 92.3% of patients with confirmed chlamydial infection when culture and *polymerase chain reaction* (PCR) were used concomitantly. Isolated chlamydiae strains were able to cause infection, indicating the hematogenous spread of *C. trachomatis* in the human body. The pathogen was present in both the genital tract mucosa and the serum in patients with acute genital chlamydial infection. However, *C. trachomatis* was isolated much more frequently from the serum than the genital

specimens in patients with chronic genital infection or extragenital infection (25.5% vs 6.4% in chronic infection; 54.9% vs 31.3% in arthritis). Therefore, serum testing for *C. trachomatis* in patients with chronic or complicated forms of chlamydial infection is a novel approach to direct detection of the pathogen regardless of site of infection. This approach may also be appropriate for the screening of asymptomatic patients.

Key words: *Chlamydia trachomatis*, genital chlamydia infection, persistence, bacteremia, hematogenous spread, persistent Chlamydiae.

Введение

Урогенитальная хламидийная инфекция является самой распространенной бактериальной инфекцией, передаваемой половым путем. По данным ВОЗ, заболеваемость урогенитальным хламидиозом за период с 2000 по 2005 гг. в развитых странах имеет тенденцию к возрастанию. Например, в Швеции заболеваемость выросла с 218 до 376 случаев на 100 тыс. населения. И это несмотря на активно предпринимаемые меры по контролю за этим заболеванием, к числу которых, в первую очередь, относится принципиальное улучшение диагностики благодаря внедрению амплификационных технологий и проведению государственных программ скрининга.

В нашей стране заболеваемость в 2003 г. была зафиксирована на уровне 100 новых случаев на 100 тыс. населения, что, по мнению специалистов, не отражает истинной, более неблагоприятной ситуации [1].

Широкое распространение хламидиоза связано с тем, что мало- и бессимптомные случаи, а также хронические хламидиозы плохо диагностируются, при этом последние представляют собой серьезную проблему с точки зрения выбора антибактериальной терапии [2–5].

Известно, что после перенесенного острого хламидиоза в большинстве случаев развивается хроническая инфекция, приводящая к нарушениям репродуктивной функции, внутриутробному инфицированию плода, патологии новорожденных [6,

7–9]. Это негативно сказывается на показателях перинатальной и детской смертности и на показателях состояния здоровья населения в целом. Помимо поражений урогенитального тракта, хламидиоз сопровождается развитием серьезных заболеваний экстрагенитальной локализации, таких как синдром Рейтера, офтальмохламидиоз, перигепатит, холецистит, тазовый перитонит. Возникает вопрос о путях распространения хламидий в организме. Известно, что основным путем распространения хламидий является каналикулярный. Гематогенный и лимфогенный пути характерны лишь для возбудителя венерической лимфогранулемы – *C. trachomatis* серовар LGV [10]. Однако случаи экстрагенитальной локализации хламидиозов и внутриутробное заражение плода трудно объяснить только каналикулярным путем распространения урогенитальных серовариантов *C. trachomatis*.

Развитие хронических хламидиозов определяется в большей степени адаптационными свойствами патогена и образованием его персистирующих форм, способных длительно выживать в условиях макроорганизма, поражать различные органы и ткани, модифицировать клеточный ответ, инактивируя защитные реакции организма. Среди них – подавление апоптоза, модуляция сигнальных путей клетки, деградация или хроническая гиперактивация транскрипционных факторов и др.

К настоящему времени детально охарактеризованы персистирующие формы хламидий, индуцированные *in vitro* на моделях клеточных культур под влиянием различных неблагоприятных воздей-

ствий [11, 12]. Их молекулярная характеристика позволила показать, что переход в персистирующее состояние регулируется, в значительной степени, на уровне транскрипции генов [12–14]. Были охарактеризованы специфические «паттерны» персистенции, связанные со снижением уровня экспрессии генов, кодирующих антигенные детерминанты, с нарушением процесса деления клеток, увеличением уровня метаболической зависимости от клетки хозяина и в то же время сохранением или усилением экспрессии генов, кодирующих факторы, модулирующие клеточный ответ [12].

Атипичные, персистирующие формы *C. trachomatis* очень часто выявляются и в клиническом материале при хроническом течении инфекции. Они могут быть выделены из материала соскоба слизистой урогенитального тракта или конъюнктивы и детектированы с помощью амплификационных методов [4, 5, 11]. Применение иммунофлуоресцентного и культурального методов существенно лимитировано из-за утраты персистирующими формами основных антигенов, в результате чего они плохо выявляются при окрашивании стандартными наборами моноклональных антител. Так как персистирующие *in vivo* хламидии практически не культивируются, это состояние патогена еще мало изучено, как с точки зрения биологических, так и молекулярно-биологических характеристик [15, 16].

Материал и методы исследования

Культуральный метод. Для культивирования *C. trachomatis* использовали монослой клеток McCoу. 1 мл сыворотки крови центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 45 мин при температуре 4 °С, осадок ресуспендировали в 1 мл транспортной среды (RPMI с добавлением 5% фетальной сыворотки, глюкозы, амфотерицина В и гентамицина). Заражение проводили в 24-луночном планшете. После заражения планшет центрифугировали при 3000 об/мин при температуре 30 °С в течение 1 часа. После инкубации в термостате (37 °С, 5% CO₂) в течение 2 часов удаляли среду и добавляли 1 мл среды с циклогексимидом. Планшет помещали в термостат (37 °С, 5% CO₂) на 72 часа. Выявление хламидий проводили двумя методами: РИФ с моноклональными антителами к ЛПС и белку МОМР, меченными ФИТЦ, и Real-time PCR с ДНК, выделенной из культуры клеток.

Метод ультратонких срезов (трансмиссионная электронная микроскопия). Препарат фиксировали по методу Ито–Карновски [17]: буферный раствор (фосфатный буфер, рН 7,8) пикриновой кислоты и глютаральдегида, с дополнительной фиксацией 1% раствором четырехоксида осмия на

какодилатном буфере и уранилацетатом (1% водный раствор), обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (50, 70, 96 и 100%), заливали в метакрилатную смолу LR White по описанной методике [18]. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB 3 с толщиной срезов 200–300 Å, помещали на никелевые сетки с формваровой подложкой.

Ультратонкие срезы окрашивали по методу E.S. Reynolds [19] и анализировали в электронном микроскопе JEM-100В.

Выделение ДНК. Для выделения ДНК из культуры клеток материал из лунки переносили в пробирку и центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 30 мин при температуре 4 °С. Отбирали 800 мкл надосадочной жидкости. Осадок ресуспендировали в 200 мкл оставшегося супернатанта. Выделение ДНК проводили набором QIAamp DNA Blood Mini Extraction Kit (QIAGEN, Inc). ДНК выделяли из 1 мл сыворотки.

Выделение РНК из культуры клеток. Из лунки с инфицированными клетками удаляли среду и добавляли 175 мкл лизирующего буфера из набора SV Total RNA Isolation Kit (Promega). Переносили пробу в пробирку и далее выделяли в соответствии с протоколом.

Real-time PCR (ПЦР в реальном времени). Для детекции и количественного определения *C. trachomatis* в образцах использовали метод Real-time PCR. В качестве мишени была выбрана последовательность ДНК из криптоической плазмиды. Для амплификации ДНК *C. trachomatis* в локусе pLGV440 с помощью программ Primer3 и Oligo38 были определены праймеры и TaqMan зонд: CPf-5'-GGG ATT CCT GTA ACA ACA AGT CAG G-3', CPf-5'- CCT CTT CCC CAG AAC AAT AAG AAC AC-3', CHt- ROX-CTC CCA GAG TAC TTC GTG CAA GCG CTT TGA –BHQ2.

Проверку специфичности выбранных праймеров и зондов проводили с использованием поисковой системы BLAST, а также в ПЦР на образцах ДНК следующих видов микроорганизмов: *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*.

При оптимизации ПЦР подбирали концентрации компонентов реакционной смеси и температурный режим амплификации, обеспечивающие максимальную чувствительность и специфичность обнаружения ДНК хламидий.

Для получения количественного стандарта амплификационные фрагменты криптоической плазмиды клонировали в составе вектора pGEM-

Таблица 1. Последовательности праймеров, выбранных для анализа экспрессии генов *C. trachomatis*

Ген	Белок	Праймеры
<i>16 S rRNA</i>	–	forward 5'-GGCGTATTTGGGCATCCGAGTAACG-3' reverse 5'-TCAAATCCAGCGGGTATTAACCGCCT-3'
<i>groEL</i>	HSP60	forward 5'-TCTGCGAACGAAGGATATGA-3' reverse 5'-ATAGTCCATTCCTGCGCCAGG-3'
<i>omp1</i>	МOMP	forward 5'-CGTTCGTTGCAGACTTACCA-3' reverse 5'-GTTCCCTCGCATACCGAATGT-3'
<i>omcA</i>	OMP3	forward 5'-GTTGCTTCGAAGATCCATGC-3' reverse 5'-GGGCCATGTTTAGCATCTTG-3'
<i>omcB</i>	OmcB	forward 5'-CTGCAACAGTATGCGCTTGT-3' reverse 5'-CACGCTGTCCAGAAGAATGA-3'
<i>pmpA</i>	PmpA	forward 5'-GCATTTAGCGGCAATACCAT-3' reverse 5'-TGACAATGCCATGACAGGAT-3'
<i>pmpB</i>	PmpB	forward 5'-GAAGGCGGTGCTATCTTCTCTC-3' reverse 5'-TCGCTTGCTGTTTGTAGCTTTAG-3'
<i>pmpC</i>	PmpC	forward 5'-CACCTACGACAACACCAACG-3' reverse 5'-GGAGCAATATCACCCGTCAG-3'
<i>pmpD</i>	PmpD	forward 5'-GTTAGACCAAATTCGAGATC-3' reverse 5'-AAGATTCTCCGTCACGAGGA-3'
<i>pmpE</i>	PmpE	forward -СТААСТГСТАТСТСГАТААСС-3' reverse 5'-TCACGAATCTCCACGGTAGG-3'

Т. Концентрация положительного контрольного образца составляла 1 мкг/мл.

Для контроля ингибирования реакции в тест-систему был также введен внутренний положительный контроль (плазмидная ДНК рTgt2, праймеры и зонд, меченный красителем Cy5).

ПЦР в реальном времени проводили на приборе «АНК-32» (Институт аналитического приборостроения, Санкт-Петербург). Мы использовали мультиплексную TaqMan ПЦР с двумя различными зондами, содержащими различные флуоресцентные метки на 5'-конце и гасители флуоресценции на 3'-конце.

Объем реакционной смеси составлял 25 мкл и включал: 2,5 мкл 10× ПЦР буфера, 62 мкМ MgCl₂, 6,2 мкМ DNTP, по 5 пмоль праймеров, 2,5 пмоль зонда, 2,5 ед. термостабильной полимеразы, 10 мкл ДНК. Температурно-временной профиль был следующим: денатурация 95° спиртом – 300 с; цикл (50), включающий отжиг 62° спиртом – 20 с и элонгацию 95° спиртом – 50 с.

Для количественного анализа была создана калибровка плазмиды с известной концентрацией. Метод позволял стабильно детектировать 30 копий плазмиды, что соответствует 3 хламидиям, так как одна клетка содержит 6–10 копий плазмид.

ОТ-ПЦР. Для постановки реакции обратной транскрипции использовали праймер Random hexamer и фермент M-MLV (фирма Силекс). ПЦР с полученной кДНК проводили с выбранными прай-

мерами на определенные гены (табл.1). Детекцию ДНК проводили с помощью электрофореза в агарозном геле.

Выделение ДНК из тканей. Образцы тканей гомогенизировали в 1 мл 1% раствора PBS. Полученную суспензию в объеме 300 мкл лизировали при температуре 55 °С в течение 4 часов в 300 мкл лизирующего буфера с протеиназой К (набор QIAamp DNA Blood Mini Extraction Kit, QIAGEN, Inc). Далее выделение ДНК проводили по протоколу.

Результаты исследования

Выделение *C. trachomatis* культуральным методом из сыворотки крови больных с хламидийной инфекцией. Была обследована группа больных из 40 человек с диагнозом урогенитального хламидиоза. Диагноз был поставлен на основании выявления ДНК возбудителя с помощью ПЦР в соскобном материале из уретры или цервикального канала, либо на основании положительных результатов в культуральном тесте. С целью выявления *C. trachomatis* в сыворотке крови у этих больных использовали культуральный метод.

Заражение клеток McCoу образцами сывороток проводили по стандартной методике. Через 72 часа после заражения клетки окрашивали моноклональными антителами к белку МOMP и к ЛПС. В 31 случае из 40 проанализированных сывороток был получен положительный результат. Во всех пре-

паратах выявлялись единичные, мелких и средних размеров, внутриклеточные хламидийные включения. Такие включения окрашивались используемыми моноклональными антителами значительно слабее, чем типичные включения *C. trachomatis*. По морфологии и интенсивности окрашивания моноклональными антителами выделяемые из сыворотки крови хламидии были подобны тем, которые выделяются из соскобов урогенитального тракта от больных при хронической форме инфекции. Для таких персистирующих форм *C. trachomatis*, выделяемых из клинического материала, показано снижение экспрессии ряда поверхностных антигенов, в том числе белка наружной мембраны МОМР [12].

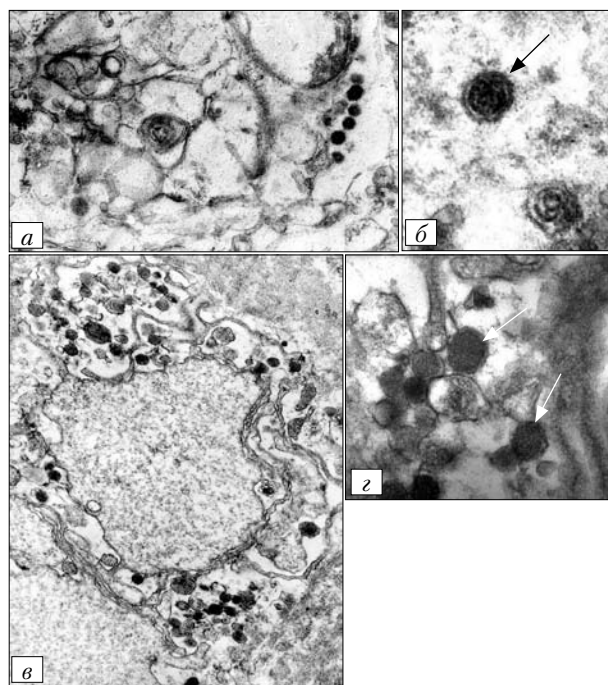
Для подтверждения результатов культурального метода и повышения специфичности выявления *C. trachomatis* детекцию возбудителя в культуре клеток, помимо стандартного метода иммунохимического анализа, проводили также с помощью ПЦР. Для этого из монослоя инфицированных клеток через 72 часа после инкубации выделяли ДНК и тестировали в ПЦР. При использовании видоспецифической тест-системы к последовательности криптогической плазмиды *C. trachomatis* в 37 образцах были получены положительные результаты. 28 образцов из 31 положительного в культуральном тесте были подтверждены с помощью ПЦР. Еще в 9 образцах среди тех, в которых не удавалось выявить включения после окрашивания моноклональными антителами, также была детектирована ДНК *C. trachomatis*. Это свидетельствует о том, что оценка результатов культурального теста с помощью ПЦР в случае выявления атипичных форм хламидий является более информативной и, безусловно, строго специфичной по сравнению с традиционным окрашиванием моноклональными антителами. Связано это с тем, что выделяемые от больных хламидии формировали включения измененной морфологии со слабо окрашивающимися структурами, что существенно снижало возможность их иммунохимического выявления.

В дальнейшем детекцию результатов культурального теста проводили с использованием двух методов: иммунофлуоресценции и ПЦР, в т.н. формате «расширенного золотого стандарта». Образцы учитывались как положительные только в тех случаях, когда получали положительный результат в ПЦР. При этом иммунофлуоресцентное окрашивание также было необходимо, так как позволяло оценивать состояние патогена, выделяемого от больных. Тем самым, применение метода «расширенного золотого стандарта» дает возможность дифференцировать различные формы инфекции: острую и хроническую. Во всех проанализирован-

ных нами случаях выделенные из сыворотки крови клинические изоляты *C. trachomatis* характеризовались измененной морфологией внутриклеточных включений, характерной для персистирующих форм.

Выросшие после первичного заражения клеток атипичные формы *C. trachomatis* были культивируемы, т.е. формировали включения при последующих пассажах в культуре клеток. Включения, вырастающие на 1-м и 2-м пассажах, имели такую же измененную морфологию, на 3-м пассаже в некоторых случаях наблюдали более яркое окрашивание анти-МОМР моноклональными антителами, что может свидетельствовать о восстановлении синтеза белка МОМР у персистирующих форм клинических изолятов при культивировании *in vitro*.

Таким образом, впервые было экспериментально установлено, что у больных с подтвержденным диагнозом урогенитального хламидиоза нижних отделов мочеполовой системы в 92,5% случаев в крови циркулирует *C. trachomatis*. Возбудитель характеризовался инфекционностью, вызывая зара-



Микрофотограмма ультратонкого среза препарата элементарных телец *C. trachomatis* серовар L-2 и элементарных телец, выделенных из сыворотки крови больного. а – *C. trachomatis* серовар L-2 – общий вид, ув. 35 000; б – *C. trachomatis* серовар L-2, ув. 60 000; в – элементарные тельца, выделенные из сыворотки больного (общий вид), ув. 32 000; г – элементарные тельца, выделенные из сыворотки больного, ув. 60 000.

Таблица 2. Анализ экспрессии генов *C. trachomatis* с помощью ОТ-ПЦР у клинических изолятов, полученных из сыворотки крови больных

Ген	Белок	Результат ОТ-ПЦР
16S рРНК	–	+
<i>groEL</i>	HSP60	+
<i>omp1</i>	МOMP	+
<i>omcA</i>	OMP3	+
<i>omcB</i>	ОмсВ	–
<i>ptpA</i>	PmpA	–
<i>ptpB</i>	PmpB	+
<i>ptpC</i>	PmpC	–
<i>ptpD</i>	PmpD	+
<i>ptpE</i>	PmpE	+

жение клеток *in vitro*, т. е. можно говорить о наличии у этих больных хламидийной бактериемии. Выделяемые из сыворотки крови больных хламидии имели признаки, характерные для атипичных, персистирующих форм возбудителя, у которых изменена морфология внутриклеточных включений и экспрессия генов, кодирующих ключевые хламидийные антигены.

Электронно-микроскопическая характеристика циркулирующих в крови хламидий. Образцы сывороток больных (n=3), положительных на присутствие в них *C. trachomatis*, в объеме 15–20 мл центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 1 часа. Осадок фиксировали для приготовления ультратонких срезов по стандартной методике. Во всех образцах выявляли присутствие клеток, имеющих характерную для элементарных телец хламидий структуру (рисунок). У клеток четко выявлялась двухслойная мембрана клеточной стенки и электронно-плотная цитоплазма. Размеры клеток колебались в диапазоне от 0,2 до 0,3 мкм, т.е. в сыворотке крови больных с урогенитальным хламидиозом были выявлены элементарные тельца – внеклеточные инфекционные формы хламидий.

Анализ экспрессии генов, кодирующих белки наружной мембраны, у клинических изолятов *C. trachomatis* методом ОТ-ПЦР. Для анализа генной экспрессии у *C. trachomatis*, циркулирующих в крови больных, выделяли РНК из культуры клеток, зараженных образцами сывороток через 48 часов после инфицирования. Для постановки ОТ-ПЦР были выбраны праймеры к генам, кодирующим 8 белков наружной мембраны *C. trachomatis*, к гену белка теплового шока 60 кДа (HSP 60) и гену, кодирующему 16S рРНК. Результаты свидетельствовали о том, что выде-

ляемые из сыворотки крови атипичные формы хламидий метаболически активны (табл. 2). Было показано, что у них выявляется экспрессия генов, кодирующих 16S рРНК и HSP 60. Анализ экспрессии ряда генов, кодирующих белки наружной мембраны, позволил выявить 5 транскрибируемых генов, среди них: *omp1*, *omcA*, *ptpB*, *ptpD* и *ptpE*.

Для 3 генов экспрессия не была выявлена, в том числе для гена, кодирующего родоспецифический белок ОмсВ. Как было ранее показано, для индуцированных в условиях *in vitro* персистирующих форм *C. trachomatis* [12, 13] отсутствие экспрессии этого гена является маркером персистентного состояния, так как белок ОмсВ экспрессируется на поздних стадиях типичного жизненного цикла хламидий, при образовании внеклеточных форм, и не выявляется при внутриклеточном персистировании. Выяснение, экспрессируется ли этот богатый цистеином белок наружной мембраны элементарных телец у циркулирующих в крови форм *C. trachomatis*, будет более детально исследоваться в дальнейшем.

Выделение *C. trachomatis* из сыворотки крови с помощью количественного варианта ПЦР. Выявление хламидийной бактериемии у больных с урогенитальным хламидиозом позволило в дальнейшем разработать метод детекции *C. trachomatis* в сыворотке крови с помощью количественного варианта ПЦР. Для этого была отработана методика выделения ДНК из 1 мл сыворотки. Был разработан метод количественной детекции ДНК на основе Real-time PCR с использованием TaqMan зондов.

Было показано, что ДНК *C. trachomatis* выделялась из сыворотки крови в количестве от 10^2 до 5×10^3 геном-эквивалентов на 1 мл (ГЭ/мл). Специфичность выявления ДНК *C. trachomatis* в клинических образцах была подтверждена секвенированием полученных ампликонов. Кроме того, проводили амплификацию ДНК с использованием в качестве мишеней разных областей генома *C. trachomatis*: фрагменты генов *ompA*, *omcB*, 16S рРНК, *groEL*. При использовании всех праймеров были получены положительные результаты.

Выявляемая с помощью ПЦР ДНК с большой долей вероятности присутствует в составе целых бактериальных клеток, а не в свободном виде. Об этом свидетельствуют результаты экспериментов по обработке ферментом ДНК-азой образцов сыворотки до выделения ДНК. Было показано, что фермент не влияет на количество выделяемой ДНК из образцов до и после обработки ДНК-азой.

Количество выявляемой в сыворотке крови больных ДНК было существенно меньше, чем в соскобном материале. Это было показано при обследовании

Таблица 3. Сравнение количества геном-эквивалентов (ГЭ) *C. trachomatis*, выявляемых при прямом выделении из сыворотки и после культивирования в культуре клеток при использовании метода Real-time PCR

Больной	ГЭ <i>C. trachomatis</i> в 1 мл сыворотки крови	ГЭ <i>C. trachomatis</i> , выделенных из культуры клеток, после заражения монослоя 1 мл сыворотки крови
2	2,54×10 ²	1,36×10 ⁶
6	8,21×10 ²	2,54×10 ⁴
9	4,21×10 ²	4,41×10 ⁴
15	2,78×10 ²	3,27×10 ⁵
19	3,05×10 ²	9,21×10 ⁴

довании группы больных с урогенитальным хламидиозом. У 15 пациентов одновременно анализировали образец соскоба и сыворотку крови при использовании одной и той же системы Real-time PCR. Если количество выявляемой в соскобном материале ДНК составляло от 6×10² до 5×10⁴ ГЭ на пробу, то в сыворотке у этих же больных ДНК присутствовала в количествах от 10² до 2×10³ ГЭ/мл.

Использование для анализа в ПЦР сыворотки крови отличается от тестирования соскобных образцов тем, что появляется возможность определять бактериальную нагрузку благодаря применению количественного варианта ПЦР для стандартного объема образца. Определение хламидийной нагрузки у больных может оказаться важным диагностическим критерием, а также является принципиально важным для оценки эффективности проводимой терапии.

Сравнение эффективности выделения *C. trachomatis* из сыворотки крови больных культуральным методом и ПЦР. Проводили параллельное выделение *C. trachomatis* из сыворотки крови больных с симптомами урогенитальной инфекции двумя методами: культуральным и ПЦР. Всего было обследовано 197 пациентов. В 102 (51,8%) случаях возбудитель был выделен при использовании культурального метода в формате «расширенного золотого стандарта». Прямое

выявление *C. trachomatis* в сыворотке крови с помощью ПЦР дало меньшее количество положительных результатов – 87 (44,2%). Это, вероятно, связано с тем, что количество бактерий в сыворотке некоторых пациентов достаточно мало, что находится за пределами чувствительности ПЦР. В то же время, полученные результаты указывают на то, что в культуральном тесте, при заражении клеток, происходит накопление бактерий, так как циркулирующие в крови формы хламидий характеризуются культивируемостью или инфекционностью. Так, при использовании количественного варианта Real-time PCR и при сравнении количества выделяемых ГЭ хламидий при прямом выделении из сыворотки крови и после культивирования в клетках количество бактерий возрастало на 2–4 порядка (табл. 3).

Параллельное выявление *C. trachomatis* в соскобах и сыворотке крови методом ПЦР у больных с различными формами урогенитальной и экстрагенитальной инфекции. Для исследования были выбраны две группы больных с проявлениями урогенитальной инфекции: с острыми инфекциями нижних отделов мочеполовой системы – 13 человек и с хроническими инфекциями нижних и верхних отделов мочеполовой системы – 267 человек, а также группа больных с артритами – 51 человек и 124 человека с бессимптомным течением заболевания.

Таблица 4. Сравнение эффективности выделения *C. trachomatis* из соскобного материала и из сыворотки крови больных с различными формами урогенитального хламидиоза методом ПЦР

Группы больных	Число (%) больных, у которых <i>C. trachomatis</i> выявлена в соскобном материале	Число (%) больных, у которых <i>C. trachomatis</i> выявлена в сыворотке крови
С острыми инфекциями нижних отделов мочеполовой системы (n = 13)	11 (84,6)	12 (92,3)
С хроническими инфекциями нижних и верхних отделов мочеполовой системы (n = 267)	24 (6,4)	60 (22,5)
С артритами (n = 51)	16 (31,3)	28 (54,9)
С бессимптомным течением хламидиоза (n = 124)	4 (4,9)	24 (19)

У всех пациентов проводили одновременное исследование образцов соскобного материала и сыворотки крови на присутствие *C. trachomatis* методом ПЦР с использованием одной и той же системы (табл. 4).

В группе больных с острой формой уретрита и цервицита выявление ДНК *C. trachomatis* было практически одинаковым: в 84,6% случаев в соскобном материале и в 92,3% – в сыворотке крови. Однако в группе с хроническими формами инфекции, такими как хронический уретрит, простатит, цервицит, сальпингоофорит, хламидии удавалось выявлять в сыворотке крови значительно в большем проценте случаев (22,5%) по сравнению с выявлением в соскобном материале (6,4%).

Отдельно была проанализирована группа больных из 44 человек с хроническими заболеваниями урогенитального тракта и осложненными формами восходящей инфекции, у которых были собраны данные анамнеза за последние 10 лет. В соскобном материале методом ПЦР *C. trachomatis* была обнаружена у 5 человек. В сыворотке крови у этих больных методом ПЦР или культуральным методом в сочетании с ПЦР *C. trachomatis* была обнаружена у 26 человек. У всех 5 пациентов, положительных по соскобному материалу, *C. trachomatis* выявлялась также и в сыворотке. Хламидиоз в анамнезе за последние 2–10 лет был у 20 человек. Среди них *C. trachomatis* в сыворотке была обнаружена у 14 человек, в соскобе – у 3.

Таким образом, впервые было обнаружено, что у пациентов с хроническими и осложненными формами заболеваний урогенитального тракта, у которых в анамнезе был поставлен диагноз «хламидиоз», в сыворотке крови в 70% присутствует возбудитель. При этом *C. trachomatis* в соскобном материале выявлялась значительно реже – в 15% случаев.

Более эффективное выявление возбудителя в сыворотке крови было показано также для группы больных с артрологической патологией: в соскобе из урогенитального тракта *C. trachomatis* была выявлена у 16 (31,3%) пациентов, а в образцах сыворотки – у 28 (54,9%) больных.

Из 124 обследованных человек без выраженных клинических симптомов в 4 (4,9%) случаях *C. trachomatis* детектировалась в соскобном материале и в 24 (19%) случаях – в сыворотке крови.

Таким образом, при острой хламидийной инфекции нижних отделов мочеполовой системы возбудитель одинаково эффективно выявляется как в тканях слизистой, так и в сыворотке крови. В случае хронических инфекций урогенитального тракта, а также при экстрагенитальной патологии

частота обнаружения *C. trachomatis* в сыворотке была существенно выше. Это связано с тем, что в случае локальной и восходящей инфекции патоген не всегда доступен для анализа при использовании соскобного материала, при этом, как было выявлено, возбудитель присутствует в организме больного и может быть обнаружен в сыворотке крови.

Выявление *C. trachomatis* в сыворотке крови у обезьян рода макак при патологии беременности и родов. При обследовании обезьян макак-резус (*Macaca mulatta*) и макак яванских (*Macaca fascicularis*), инфицированных *C. trachomatis*, было выявлено, что возбудитель с одинаковой частотой выявлялся как в соскобном материале, так и в сыворотке крови. Из 20 самок с установленным диагнозом урогенитального хламидиоза на основании выявления *C. trachomatis* с помощью метода ПЦР в урогенитальном тракте и сыворотке крови, у 40% наблюдали патологию беременности и родов, приводящую к самопроизвольным абортam и мертворождениям. У погибших при патологических родах самок в 100% (n=4) возбудитель выявляли в тканях матки при использовании метода ПЦР и иммунофлуоресценции. Обследование органов погибших детенышей позволило показать наличие возбудителя в легких, печени и почках в 85% исследованных образцов.

Обсуждение результатов исследования

Впервые получены экспериментальные данные о возможности циркуляции *C. trachomatis* в крови больных. При хламидийной инфекции нижних и верхних отделов мочеполовой системы, а также при другой ее локализации наблюдается хламидийная бактериемия. У 92,3% больных с подтвержденной хламидийной инфекцией в крови выявлялась *C. trachomatis*.

На основании полученных данных можно предположить, что в ходе хламидийной инфекции, которая развивается в слизистой оболочке урогенитального тракта, а также в тканях суставов, хламидии способны попадать в кровь, преодолевая гистогематический барьер, и циркулировать там вне клеток. Присутствие *C. trachomatis* в сыворотке крови, по всей видимости, свидетельствует о наличии очага инфекции, как в тканях мочеполовой системы, так и иной локализации. Выявляемые в крови больных хламидии обладают инфекционными свойствами, что может указывать на наличие еще мало изученного гематогенного пути распространения *C. trachomatis* в организме.

Возможность гематогенного пути распространения возбудителя урогенитального хламидиоза, до сих пор не обнаруженного, объясняет развитие

экстрагенитальной патологии, например, артритов, среди которых доля хламидийной этиологии составляет около 40% [20, 21].

Выявленный гематогенный путь распространения *C. trachomatis* придает особую актуальность проблеме внутриутробного инфицирования плода при урогенитальном хламидиозе. Многими клиническими данными доказан высокий риск заражения плода *C. trachomatis* от инфицированной матери, который достигает 60–70% [8, 9, 22]. При этом очевидно, что наблюдаемые случаи внутриутробной инфекции с тяжелым диссеминированным поражением фетоплацентарной системы и жизненно важных органов плода (мозга, печени, легких) не могут быть обусловлены только восходящей (через плодные оболочки) инфекцией или интранатальным заражением при прохождении через родовые пути. Полученные нами экспериментальные данные при спонтанной хламидийной инфекции у обезьян рода макак доказывают возможность внутриутробного заражения плода. У самок с хламидийной бактериемией в 40% случаев наблюдали патологию беременности, приводящую к гибели плода. В 85% обследованных образцов из органов погибших детенышей выделяли *C. trachomatis*. Полученные первоначальные данные указывают на необходимость проведения дальнейших исследований роли внутриутробного инфицирования плода при хламидийной инфекции.

Была проведена оценка диагностической значимости выявления возбудителя урогенитального хламидиоза в сыворотке крови. С этой целью больных обследовали с помощью общепринятого теста постановки диагноза – выявления *C. trachomatis* в соскобах слизистой уретры или цервикального канала методом ПЦР. Одновременно проводили исследование образцов сыворотки этих больных при использовании той же ПЦР тест-системы. В обследование были включены 4 группы пациентов: с острой, хронической инфекцией, с артритами и лица с бессимптомным течением хламидиоза. Было показано, что во всех группах возбудитель чаще выявлялся в сыворотке крови, чем в урогенитальном тракте, особенно у пациентов с хроническим и бессимптомным течением, что указывает на то, что возбудитель не всегда доступен в очаге инфекции, так как при урогенитальном хламидиозе значительная роль принадлежит восходящей и экстрагенитальным инфекциям. Тем самым выявление *C. trachomatis* в сыворотке крови больных, особенно в случаях хронических и осложненных форм хламидиоза, имеет важное диагностическое значение, предлагая принципиально новый подход прямого выявления возбудителя вне зависимости от лока-

лизации очага инфекции. В равной мере такой диагностический подход обоснован и при скрининговых обследованиях бессимптомных больных.

В проведенных исследованиях на клиническом материале показано, что развитие хронической хламидийной инфекции сопровождается пролиферацией и распространением патогена в организме. Совершенно очевидно, что успешное длительное выживание возбудителя возможно благодаря наличию механизмов ухода от защитных факторов макроорганизма. И действительно, у выделяемых от больных хламидий наблюдали значительное изменение в составе основных антигенов. Так, у персистирующих хламидий, циркулирующих в крови, существенно снижалось количество иммунохимически выявляемого белка наружной мембраны МОМР, являющегося основным антигеном.

Хорошо известно, что характерной особенностью хламидиозов является возможность развития хронических состояний после перенесенного заболевания. Это определяется в большей степени адаптационными свойствами патогена и образованием его персистирующих форм, способных длительно выживать в условиях макроорганизма. Персистирующие формы хламидий определяются как жизнеспособные, но некультивируемые внутриклеточные формы бактерий, у которых блокирован процесс формирования инфекционных внеклеточных форм [11]. В силу того, что такие персистирующие формы очень часто выявляются в материалах от больных, многие хламидиологи склонны рассматривать такое внутриклеточное состояние как третью форму существования хламидий, т.е. как персистирующие формы, наряду с элементарными и ретикулярными тельцами [12].

Что же происходит в инфицированном организме и каким образом поддерживается персистентная инфекция, обусловленная внутриклеточными формами, в течение длительного времени? Известно, что *C. trachomatis* колонизирует преимущественно эпителиальные клетки, значит внутриклеточная инфекция обречена на естественную элиминацию. Одним из механизмов поддержания персистентной инфекции является ее активация, т.е. образование инфекционных элементарных телец при изменении условий, вызвавших формирование персистенции.

Мы показали наличие еще одного механизма распространения и поддержания хронической инфекции. Выявляемые в крови больных формы хламидий являются четвертой формой их существования, которая представляет собой инфекционную внеклеточную форму персистентного состояния. Инфекционность циркулирующих в крови хламидий была продемонстрирована при посеве на

чувствительные линии клеток. Из сыворотки крови больных с подтвержденным диагнозом урогенитального хламидиоза микробиологически выделялись атипичные включения, по морфологии и антигенной структуре идентичные персистирующим вариантам. Окраска моноклональными антителами к МOMP указывала на практически полное отсутствие этого основного антигена в составе клеточной стенки персистирующих форм. Выросшие атипичные включения характеризовались способностью к пролиферации, так как они давали рост таких же

атипичных включений в пассажах. Видовая принадлежность таких трудно детектируемых иммунохимическими методами хламидий подтверждалась с помощью ПЦР с праймерами к разным областям генома и секвенированием ампликонов.

Выявленная модель персистенции, формируемая *in vivo*, позволит исследовать конкретные молекулярные механизмы, обеспечивающие персистенцию патогена, что заложит основу для создания стратегии лечения, профилактики и диагностики хронических хламидиозов.

Литература

1. Гомберг М. А. Персистенция хламидийной инфекции. Клинико-морфологическая характеристика, иммунные механизмы развития, терапия. Автореф дисс докт мед наук М.: 2003.
2. Senn L., Hammerschlag M.R., Greub G. Therapeutic approaches to Chlamydia infections. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6:2281-90.
3. Wang S.A., Papp J.R., Stamm W.E., Peeling R.W., Martin D.H., Holmes K.K. Evaluation of antimicrobial resistance and treatment failures for *Chlamydia trachomatis*: a meeting report. *J Infect Dis* 2005; 191:917-23.
4. Дмитриев Г. А. Урогенитальные хламидийные инфекции. Подходы к диагностике и терапии. Оригинальные статьи ИППП 2002; (2):18-21.
5. Епифановский А.И., Сидоровия С.Ю., Бармина Г.В. и др. Диагностическое значение маркеров хламидийной инфекции при осложненной, неосложненной и бессимптомной формах урогенитального хламидиоза. Оригинальные статьи ИППП 2003; (3):21-3.
6. Darville T. *Chlamydia trachomatis* infections in neonates and young children. *Semin Pediatr Infect Dis* 2005; 16:235-44.
7. Kucinskiene V., Sutaite I., Valiukeviciene S., Milasauskiene Z., Domeika M. Prevalence and risk factors of genital *Chlamydia trachomatis* infection. *Medicina (Kaunas)* 2006; 42:885-94.
8. Mardh P. A. Influence of infection with *Chlamydia trachomatis* on pregnancy outcome, infant health and life-long sequelae in infected offspring. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002; 16:847-64.
9. Савичева А.М., Бошмакова М.А. Урогенитальный хламидиоз у женщин и его последствия. Под ред. Э.К. Айламазяна. Н. Новгород: Изд-во НГМА; 1998. – 182 с.
10. Pathela P., Blank S., Schillinger J.A. Lymphogranuloma venereum: old pathogen, new story. *Curr Infect Dis Rep* 2007; 9:143-50.
11. Mpriga P., Ravaoarino M. *Chlamydia trachomatis* persistence: an update *Microbiol Res* 2006; 161:9-19.
12. Hogan R.J., Mathews S.A., Mukhopadhyay S., Summersgill J.T., Timms P. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect Immun* 2004; 72:1843-55.
13. Polkinghorne A., Hogan R.J., Vaughan L., Summersgill J.T., Timms P. Differential expression of chlamydial signal transduction genes in normal and interferon gamma-induced persistent *Chlamydia pneumoniae* infections. *Microbes Infect* 2006; 8:61-72.
14. Wehrli W., Meyer T.F., Jungblut P.R., Muller E.C., Szczepek A.J. Action and reaction: *Chlamydia pneumoniae* proteome alteration in a persistent infection induced by iron deficiency. *Proteomics* 2004; 4:2969-81.
15. Gerard H.C., Whittum-Hudson J.A., Schumacher H.R., Hudson A.P. Synovial *Chlamydia trachomatis* up regulates expression of a panel of genes similar to that transcribed by *Mycobacterium tuberculosis* during persistent infection. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:281-4.
16. Рюмин Д.В. Особенности патогенеза, течения и лечения персистирующего урогенитального хламидиоза у супружеских пар и его последствия. Дисс. канд. мед. наук. М.: 1999. 132 с.
17. Ito S., Karnovsky M.J. Proteolytic Microdissection of smooth-surfaced vesicles of liver microsomes. *Cell Biol* 1969; 39:168-9.
18. Newman G. R., Jasani B., Williams E. D. A simple post-embedding system for the rapid demonstration of tissue antigens under the electron microscope. *Histochem J* 1983; 15:543-5.
19. Reynolds E.S.J. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Cell Biol* 1963; 17:208-212.
20. Rihl M., Zeidler H. The molecular pathogenesis of *Chlamydia*-induced arthritis: where do we stand. *Curr Rheumatol Rep* 2007; 9: 4-5.
21. Villareal C., Whittum-Hudson J.A., Hudson A.P. Persistent Chlamydiae and chronic arthritis. *Arthritis Res* 2002; 4:5-9.
22. Кебу Т.И., Джикидзе Э.К., Чикобава М.Г., Аршба И.М. Спонтанная урогенитальная инфекция у обезьян рода макак. *ЖМЭИ М.*:2006; 7-91 с.