

УДК 616.987-07

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ХЛАМИДИОЗА

Д.Ф. ХВОРИК, К.М.Н., ДОЦЕНТ

Кафедра дерматовенерологии с курсом эндокринологии
УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Установлена взаимосвязь между серотипами, молекулярно-биологическими характеристиками C.trachomatis и клиническими проявлениями хламидийной инфекции.

Ключевые слова: хламидийная инфекция, ПЦР, ДНК, ИППП.

The correlation between serotypes, molecular-biological characteristics of C.trachomatis and different clinical manifestations of Chlamidia infection has been determined.

Key words: chlamydia infection, PCR, DNA, STD.

Инфекции, передаваемые половым путем (ИППП) – важнейшая медико-социальная проблема современного общества [1, 2, 3, 5, 6, 7]. Особенностью современной эпидемической ситуации является выраженная активизация процесса распространения ИППП «нового поколения», к которым, в первую очередь, относят хламидийную инфекцию (ХИ) [5]. Ежегодно в мире регистрируется 89 миллионов новых случаев заражения хламидиозом [6]. Это связано с медицинской и социальной значимостью ХИ, обусловленной целым рядом факторов: высоким уровнем заболеваемости всех слоев населения, трудностями этиологической верификации, стертой клинической симптоматикой, сложностью выбора эффективной терапии, полиморфизмом внутриутробной патологии плода и новорожденного, а также влиянием на демографические показатели [6]. Эпидемиологическая ситуация по урогенитальному хламидиозу (УГХ) также усугубляется нередкой и длительной персистенцией возбудителя у людей разного возраста. Широкое применение антибиотиков и самолечение при инфекционных заболеваниях способствуют возникновению стертых форм ХИ и носительства возбудителя [8]. Следует учитывать, что распространение хламидиоза регулируется определенными механизмами: свойствами возбудителя заболевания (вирулентность), иммунной структурой населения (восприимчивость к заболеванию), а также особенностями механизма передачи возбудителя [2].

Хламидии – это патогенные для человека микроорганизмы, они не входят в состав нормальной микрофлоры. Возбудители ХИ относятся к семейству Chlamydiaceae, роду Chlamydia. В основу подразделения хламидий на виды положены их различия в антигенном строении. Так, серологически вид *C. trachomatis* подразделяют на 18 основных сероваров: А-С выделяются в зонах, эндемичных по трахоме (конъюнктивит хламидийной этиологии); D-К верифицируются при различных клинических формах урогенитальной патологии человека, в том числе, осложненных пневмонией и конъюнктивитом; L1-L3 – соответствуют штаммам, выделенным у больных с клиническими признаками венеричес-

кой лимфогранулемы. Вид *C. psittaci* включает не менее 13 сероваров, а *C. pneumoniae* – один серовар [10, 11]. Изучая зависимость характера клинической патологии от серотипа возбудителя, установлено, что частота развития эндоцервицита и кровотечения у женщин с хламидийной инфекцией не зависит от варианта серотипа, в то время как у мужчин с низким количеством полиморфноядерных лейкоцитов в уретральных соскобах была достаточно высока вероятность выявления серотипа F или G. Серовар F был выявлен у женщины из Сан-Франциско с наличием воспаления тазовых органов [9]. В другом исследовании у мужчин с симптомами хламидиоза оказалась высока вероятность выделения сероварианта Da, в отличие от женщин, у которых выделялся серовариант K [12, 13].

Выраженный полиморфизм клинических проявлений и отсутствие патогномоничных симптомов значительно осложняет клиническую диагностику хламидиозов [7]. Решающее значение в выявлении УГХ имеют методы лабораторной диагностики [3]. Среди методов идентификации возбудителя выделяют: морфологические, культуральные, иммунологические и молекулярно-биологические. В последние годы широкое распространение получили молекулярно-генетические методы диагностики ХИ, позволяющие, помимо качественного ответа о наличии фрагмента ДНК, определять относительную концентрацию ДНК возбудителя в исследуемом материале.

В настоящее время для количественного анализа концентрации специфической ДНК используется метод ПЦР в режиме реального времени (Real-time PCR), сущность которого заключается в детекции накопления флуоресценции реакционной смеси, при этом интенсивность сигнала пропорциональна концентрации конечного продукта ПЦР [4]. Важнейшей особенностью этого метода является синхронизация регистрации и амплификации, что дает возможность оценить кинетику процесса, которая зависит от начального количества исследуемого наследственного материала [4, 6].

Цель исследования – установить взаимосвязь между серотипами, молекулярно-биологическими

характеристиками *S. trachomatis* и различными клиническими проявлениями хламидийной инфекции.

Материалы и методы

Клинико-микробиологическое обследование проведено 42 больным (18 женщин и 24 мужчины) в возрасте от 17 до 44 лет, обратившимся в УЗ «Гродненский областной кожно-венерологический диспансер». Больные были распределены на группы в зависимости от концентрации ДНК *S. trachomatis*, выделенных серотипов *S. trachomatis*, варианта инфекции (моно-, микст-инфекция), устойчивости/чувствительности к антибиотикам и преобладающего клинического варианта хламидийной инфекции (локализация воспалительного процесса, осложнения).

Диагноз хламидийной инфекции был установлен по клиническим проявлениям и результатам этиологической верификации: определение в сыворотке крови антител к антигенам *S. trachomatis* методом иммуноферментного анализа (ИФА), выделение хламидий в соскобе из цервикального канала и уретры методом прямой реакции иммунофлюоресценции (ПИФ). Этиологическая расшифровка микст-инфекции осуществлялась общепринятыми методами.

Для количественного определения специфических фрагментов *ompA* гена *S. trachomatis*, кодирующих главный поверхностный протеин MOMP, проводилась полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени (Rotor-Gene 3000, Австралия) с применением видоспецифичных праймеров и TaqMan олигонуклеотидных проб.

Для определения серотипов *S. trachomatis* образцы ДНК, выделенные из 42 образцов биологического материала (соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта), положительных в отношении *S. trachomatis* и прошедших этап амплификации, а также очистки с использованием Centricon-100 колонок, подвергались секвенирующей ПЦР с использованием пар праймеров для детекции вариативных доменов (VDI-VDIV) *omp1* гена.

Амплифицированные фрагменты визуализировались электрофорезом в 1% агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Для каждого из 42 образцов было характерно наличие на электрофореграмме 4 специфических фрагментов (P1/OMP2, P1/CT6R, CT6F/OMP2 и NL-F/NL-R). Длина фрагмента P1/OMP2 была представлена 1124 парами нуклеотидов (п.н.) в 28 пробах и 1114 п.н. в 14 пробах, фрагмента P1/CT6R 670 п.н. в 28 пробах и 679 п.н. в 14 пробах, фрагмента CT6F/OMP2 в 28 пробах 479 п.н., в 14 – 480 п.н., фрагмента NL-F/NL-R во всех 42 пробах 482 п.н.

ПЦР амплификоны очищались с использованием BigDye X Terminator Purification kit и подвергались секвенированию (с последующим проведением электрофореза на генетическом анализаторе ABI Prism 310) с использованием пар праймеров P1/OMP2, P1/CT6R, CT6F/OMP2, NL-F/NL-R.

Амплификоны секвенировались в двух направ-

лениях для повышения достоверности реакции. Данные обо всех нуклеотидных последовательностях собирались в единую последовательность порядка 863 пар нуклеотидов, включающую 4 *omp1* вариативных домена. Данная последовательность представляла собой порядка 73% от общей протяженности гена *S. trachomatis omp1* гена.

Данные о нуклеотидной последовательности образцов рассматривались с использованием нуклеотид-нуклеотид BLAST поисковой системы (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) для идентификации принадлежности той или иной последовательности к определенному серотипу.

Результаты и обсуждение

Сиквенс-анализ региона, включающего VDI-VDIV, показал, что 15 образцов от больных принадлежали к серотипу К с 95% соответствием последовательности геноварианта K/UW31/Cx, 23 образца относились к серотипу D, причем, для 9 образцов имело место 95% соответствие с последовательностью геноварианта D/B185 (X62919), для 3 образцов – 94% соответствие с последовательностью геноварианта D/B185 (X62919), для 11 образцов имело место 95% соответствие с последовательностью геноварианта D/B120 (X62918), 4 образца соответствовали серотипу С с 95% совпадением последовательности геноварианта C/TW-3/OT (AF352789). Исследования по изучению последовательности нуклеотидов 42 ПЦР-положительных образцов, проводимые с использованием программы BLAST, показали преимущественное превалирование генотипа *S. trachomatis* серотипа D (n=23; 54,8%) над серотипами К (n=15; 37,7%) и С (n=4; 9,5%), при этом имели место различного рода нуклеотидные изменения в исследуемом фрагменте *omp1* гена. Следует отметить, что 19 изолятов, выделенных из биологического материала и идентифицированные как серотип D, различались по 2-м нуклеотидам от D/B185 или D/B120 гена *omp1* в позициях 574 и 843, а 4 образца имели дополнительное нуклеотидное изменение в позиции 1042. В то же время, 15 изолятов, идентифицированные как серовар К, различались по 2-м нуклеотидам от K/UW31/Cx гена *omp1* в позициях 503 и 628, а 4 изолята, идентифицированные как серовар С, различались по 4-м нуклеотидам от C/TW-3/OT гена *omp1* в позициях 569, 571, 972 и 1003.

Таким образом, на исследуемой территории отмечено преимущественное выявление серотипов D, К и С *S. trachomatis* в биологическом материале больных с хроническими воспалительными заболеваниями урогенитального тракта. Преобладающим серотипом является вариант D (54,7%), несколько реже встречается вариант К (35,7%), еще реже – вариант С (9,6%). При этом отмечается 94-95% гомология со стандартными штаммами D/B120 (X62918), D/B 185 (X62919), K/UW31/Cx (AF063204).

Далее сопоставлен характер клинических проявлений хламидийной инфекции, топического ди-

агноза, осложнений и концентрации ДНК у больных с различными установленными серотипами возбудителя. В табл. 1 представлено распределение больных в зависимости от серотипа, осложнений, концентрации ДНК и преобладающей патологии.

Как видно из табл. 1, обращала на себя внимание группа больных, у которых был выявлен серотип С *S. trachomatis*. Несмотря на небольшое количество больных в этой группе, мужчины и женщины имели осложнения хламидийной инфекции в виде артропатической формы хламидиоза (болезни Рейтера) или бесплодия, что весьма важно учитывать в прогностическом плане. В группе пациентов с серотипами D и К *S. trachomatis* таких больных было заметно меньше. С другой стороны, ни у одного больного с серотипом D *S. trachomatis* не выявлена артропатическая форма инфекции (болезнь Рейтера), что также важно учитывать для прогноза развития осложнений. Частота такого осложнения, как бесплодие в сравниваемых группах была неодинаковой: от 13,3% при серотипе К *S. trachomatis*, 26,0% с серотипом D *S. trachomatis* и до 50% с серотипом С *S. trachomatis*. Кроме того, средний стаж заболевания пациентов с серотипом С *S. trachomatis* был значительно выше, чем у больных с серотипами К и D *S. trachomatis*.

Топический диагноз был представлен различной патологией. Среди больных мужчин с тремя серотипами *S. trachomatis* преобладали уретриты и простатиты, частота которых при серотипе К *S. trachomatis* заметно превышала показатели других групп. Среди женщин обращало внимание наличие большего количества больных с эндоцервицитами в группе с серотипом D *S. trachomatis*, чем при других серотипах. Бесплодие среди женщин диагностировано во всех группах, однако в при серотипе С *S. trachomatis* отмечено у всех больных, в группе К – у 2 из 3 больных, в группе D (D/B120 (X62918) – у 3 из 6 больных, в группе D (D/B185 (X62919) – у 3 из 7 больных.

Ранее нами было установлено, что у больных хламидийной инфекцией имело место колебание концентрации ДНК *S. trachomatis* в широких пределах, зависящее от различных причин: от условно низкого уровня (до $1,0 \times 10^4$ копий/мл), среднего – от $1,1 \times 10^4$ до $2,0 \times 10^5$, до высокого – свыше $2,1 \times 10^5$ копий/мл. Причем, средняя концентрация ДНК *S. trachomatis* без учета характера патологии и локализации воспалительного процесса у мужчин составляла $1,5 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$ копий/мл, у женщин –

Таблица 1 – Распределение наблюдаемых больных хронической формой хламидийной инфекции в зависимости от серотипа *S. trachomatis*, характера патологии, осложнений и концентрации ДНК

Пол	Серотипы <i>S. trachomatis</i>	Топический диагноз, (n)	Осложнения, (n)	Концентрация ДНК, копий/мл
Мужчины (n=24)	C/TW-3/OT (AF352789)	Уретрит (1) Простатит (1)	Болезнь Рейтера (2)	$3,3 \times 10^3 \pm 0,5 \times 10^3$
	D/B120 (X62918)	Уретрит (5)	Нет	$7,1 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^4$
	D/B185 (X62919)	Уретрит (5) Простатит (4)	Нет	$8,6 \times 10^4 \pm 0,4 \times 10^4$
	K/UW31/Cx (AF063204)	Уретрит (12) Простатит (3)	Болезнь Рейтера (3)	$4,1 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4$
Женщины (n=18)	C/TW-3/OT (AF352789)	Вульвовагинит (2)	Бесплодие (2)	$5,9 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$
	D/B120 (X62918)	Вульвовагинит + Эрозия шейки матки (2) Аднексит (2) Вульвовагинит (1) Эндоцервицит (1)	Бесплодие (3)	$6,8 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^4$
	D/B185 (X62919)	Вульвовагинит (3) Эндоцервицит (2) Аднексит (1) Эрозия шейки матки (1)	Бесплодие (3)	$5,9 \times 10^4 \pm 1,9 \times 10^4$
	K/UW31/Cx (AF063204)	Вульвовагинит (2) Эрозия шейки матки (1)	Бесплодие (2)	$2,2 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4$

$4,3 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^4$ копий/мл [4]. В связи с этим нами были проведены сравнения показателей концентрации ДНК в зависимости от серотипа *S. trachomatis*. Как видно из табл. 1, среди мужчин и женщин наиболее низкие концентрации ДНК выявлены у больных с генотипом С, что совпадало с ранее полученными данными о низком уровне ДНК у больных с осложненными формами хронической инфекции [4]. Наиболее высокие концентрации установлены при серотипе D у мужчин (выше, чем у женщин). Также более высокий уровень ДНК среди мужчин оказался при серотипе К, в 2 раза превышающий показатель женщин.

Выделение у больных хламидийной инфекцией других возбудителей инфекций, передающихся половым путем (микст-инфекции), послужило причиной изучения зависимости варианта инфекции (моно-, микст-) от серотипа (табл. 2).

Хламидии в качестве единственного этиологического агента были выявлены только у 10 пациентов (23,8 %). Среди микст-инфекционных агентов выделялись уреоплазмы (28,6%), кандиды (16,7%), микоплазмы (14,3%), трихомонады (11,9%), гарднереллы (4,8%). Как видно из табл. 2, во всех группах больных, независимо от серотипа и его вариантов, не выявлено преобладания хламидийной инфекции, протекающей в виде моноинфекции (23,8%). У всех больных с серотипом С хламидиям сопутствовали грибы рода *Candida*. Этот возбудитель редко встречался при серотипе D и не был выделен у женщин с серотипом К. В группе женщин с серотипов D заметно было преобладание трихомонад. Уреоплазмы чаще встречались в группах мужчин и женщин с серотипом К, чем в других группах.

Известна высокая частота антибиотикорезистентности (полирезистентности) *S. trachomatis* при хронической хламидийной инфекции [14]. Основными стартовыми препаратами, применяемыми для лечения хламидиоза, являются тетрациклины и макролиды. Нами изучена частота антибиотико-

Таблица 2 – Данные о наличии смешанной инфекции и показатели устойчивости *S. trachomatis* к антибиотикам у больных хламидиозом в зависимости от серотипа

Пол	Серотипы <i>S. trachomatis</i>	Вариант инфекции	Устойчивость к:	
			тетрациклам	тетрациклам и макролидам
Мужчины (n=24)	C/TW-3/OT (AF352789)	Моноинфекция (1) +Кандиды (1)	-/-	2/0
	D/B120 (X62918)	Моноинфекция (2) +Уреаплазмы (1) +Микоплазмы (1) +Кандиды (1)	4/0	1/0
	D/B185 (X62919)	Моноинфекция (1) +Уреаплазмы (4)	3/1	1/1
	K/UW31/Cx (AF063204)	Моноинфекция (5) +Кандиды (3) +Уреаплазмы (3) +Микоплазмы (1)	6/0	6/0
Женщины (n=18)	C/TW-3/OT (AF352789)	Моноинфекция (1) +Кандиды (1)	0/0	2/0
	D/B120 (X62918)	+Трихомонады (3) +Микоплазмы (2) +Гарднереллы (1)	4/1	1/1
	D/B185 (X62919)	+Трихомонады (2) +Микоплазмы (2) +Гарднереллы (1) +Уреаплазмы (1) +Кандиды (1)	2/1	4/1
	K/UW31/Cx (AF063204)	+Уреаплазмы (2) +Микоплазмы (1)	2/0	1/0

резистентности *S. trachomatis* к данным антибиотикам в зависимости от варианта серотипа возбудителя. Обращало внимание то, что *S. trachomatis* всех больных с серотипом С была 100% устойчива как к тетрациклам, так и к макролидам одновременно. Если учесть, что это были больные с осложненными вариантами инфекции, то можно найти объяснения данному факту.

Такая же ситуация отмечена у больных с серотипом К, у которых все выделенные штаммы *S. trachomatis* имели резистентность к испытываемым антибиотикам, а среди больных так же, как в группе с серотипом С, были пациенты с осложненными формами (артропатический вариант и бесплодие), что совпадало с известными данными о преимущественном персистировании возбудителя, связанного с серотипом группы С [9].

Заключение

На основании проведенных исследований было установлено преимущественное распространение серотипов D (54,7%), K (35,7%) и C (9,6%) *S. trachomatis* в биологическом материале пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями уrogenитального тракта. При этом в 94-95% отмечается гомология со стандартными штаммами D/B120 (X62918), D/B185 (X62919), K/UW31/Cx (AF063204). Установлено, что для 19 изолятов, идентифицированных как серотип D, было характерно наличие различий по двум нуклеотидам от D/B185 или D/B120 гена *omp1* в позициях 574 и 843, а 4 образца имели дополнительное нуклеотидное изменение в позиции 1042; в отношении серотипа К были выявлены нуклеотидные изменения от K/UW31/Cx гена *omp1* в позициях 503 и 628. Однако наибольшим числом нуклеотидных замен в данном исследовании характеризуется серотип

С, в отношении которого выявлены различия от C/TW-3/OT гена *omp1* по 4-м нуклеотидам в позициях 569, 571, 972 и 1003.

Сопоставительный анализ серологического варианта возбудителя с клиническими проявлениями показал, что более частыми причинами восполнительных процессов уrogenитального тракта являются серотипы D и К *S. trachomatis*, вызывающие развитие уретрита, аднексита, эндоцервицита и другой патологии. С серотипом С и К *S. trachomatis* прослеживается ассоциативная взаимосвязь развития осложненных форм УГХ в виде артропатических форм и бесплодия. Дан-

ные сероварианты чаще обладают высокой степенью антибиотикорезистентности, что может быть одной из причин формирования осложнений ХИ.

Литература

1. Адаскевич, В.П. Инфекции, передаваемые половым путем: руководство для врачей / В.П. Адаскевич.-М., 1999.-215 с.
2. Аковбян, В.А. Болезни, передаваемые половым путем: уроки прошлого и взгляд в будущее / В.А. Аковбян, В.И. Прохоренков // Вестник дерматологии и венерологии.-1995.-№3.- С.16-19.
3. Делекторский, В.В. Лабораторная диагностика уrogenитального хламидиоза / В.В. Делекторский, Г.Н. Яшкова, С.А. Мазурчук // Клиническая лабораторная диагностика. – 1995. – № 6. – С.108-110.
4. Костюк, С.А. Новые аспекты клинического применения полимеразной цепной реакции / С.А. Костюк, О.К. Кулага, Д.Ф. Хворик // Медицинские новости. – 2006.- №5.-С.14-18.
5. Лобзин, Ю.В. Хламидийные инфекции / Ю.В. Лобзин, Ю.И. Ляшенко, А.Л. Позняк. – СПб.: ООО «Издательство ФОЛИАНТ», 2003.-400с.
6. Семенов, В.М. Хламидийная инфекция / В.М.Семенов, Д.М.Семенов, Д.Ф.Хворик.- Витебск, 2005. – 206 с.
7. Скрипкин, Ю.К. Проблема диагностики и лечения уrogenитального хламидиоза в России / Ю.К. Скрипкин, А.А. Кубанова., В.А. Аковбян // Антибиотики и химиотерапия. – 1996. -№ 2. – С.5-8.
8. Шинский, Г.Э. Эпидемиологические аспекты хламидийной инфекции / Г.Э. Шинский, В.А. Мерзляков, С.Б. Тимофеева. // Вестник дерматологии и венерологии. -1999-№1.-С.11-13.
9. Dean, D. Recombination in the genome of *Chlamydia trachomatis* involving the polymorphic membrane protein C gene relative to *ompA* and evidence for horizontal gene transfer / D. Dean // J.Bacteriol., 2004.-Jul.-186 (13):4295-306.
10. Frost, S.D. Using sexual affiliation networks to describe the sexual structure of a population/ S.D. Frost // Sex. Transm. Infect., 2007.-Aug;83. – Suppl 1:137-42.
11. Lundemose, A.G. Characterization and identification of early proteins in *Chlamydia trachomatis* serovar L2 by two-dimensional gel electrophoresis / A.G. Lundemose, S. Birkelund, P.M. Larsen // Infection. Immun. – 1990. -Vol. 58. – P. 2478.
12. Morre, S.A. Murine models of *Chlamydia trachomatis* genital tract infection: use of mouse pneumonitis strain versus human strains/ S.A. Morre, J.M. Lyons // Infect. Immun.- 2000.-Dec;68(12):7209-11.
13. Morre, S.A. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens will facilitate large epidemiological studies/ S.A. Morre, R. I. Moes, J.P. Van Valkengoed, J.T. Boeke, C.J. Van Eijk Meijer, A.J. Van den Brule// J. Clin. Microbiol.-1998.- Oct;36(10):3077-8.
14. Persson, K. The role of serology, antibiotic susceptibility testing and serovar determination in genital chlamydial infections / K. Persson // Best Pract. Res. Clin. Obstet Gynaecol., 2002.-Dec;16 (6):801-14.

Поступила 08.05.08